

Demyelinisierung und Axonschaden in der
MOG₃₅₋₅₅-induzierten experimentellen
autoimmunen Enzephalomyelitis der C57BL/6-Maus
–
eine ultrastrukturelle Studie

Mascha Sarah Recks



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof Dr. Dr. Stefan Arnhold

und

dem Institut I für Anatomie des Fachbereiches Medizin der Universität zu Köln

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Addicks

**Demyelinisierung und Axonschaden in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten
experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis der
C57BL/6-Maus – eine ultrastrukturelle Studie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Mascha Sarah Recks

Tierärztin aus Köln

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prof. Dr. Klaus Addicks

Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation: 04. Juli 2012

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Mascha Sarah Recks

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Verlaufsformen.....	1
1.1.2	Pathogenese der MS.....	2
1.1.2.1	Inflammation.....	2
1.1.2.2	Demyelinisierung.....	4
1.1.2.3	Axonschaden.....	5
1.2	Tiermodelle der MS	6
1.3	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	7
1.3.1	Geschichte der EAE	7
1.3.2	Induktion der EAE	8
1.4	Histopathologie der C57BL/6-EAE	10
1.4.1	Unterschiede in ZNS-Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigung ..	10
1.4.2	Unterschiede in der Schädigung verschiedener ZNS-Bahnsysteme	12
1.5	MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE der B6-Maus	13
1.5.1	MOG	13
1.5.2	Lichtmikroskopische Charakteristika der MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE.....	14
1.5.2.1	Abhängigkeit der ZNS-Histopathologie vom Krankheitsstadium	14
1.5.2.2	Bestimmung des klinischen Scores durch das Ausmaß der ZNS-Läsionen	14

1.6	Ultrastrukturelle Merkmale der Neurodegeneration	16
1.6.1	Myelinpathologie	16
1.6.1.1	Remyelinisierung	17
1.6.2	Axonschaden	18
1.6.2.3	Vergrößerung der axonalen Mitochondrien	18
1.6.2.4	<i>Nearest neighbour neurofilament distance</i>	19
1.6.2.5	<i>Inner tongue</i>	20
1.7	Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Mäuse	23
2.2	Tierexperimentelle Methoden	24
2.2.1	Induktion der EAE	24
2.2.1.1	Herstellung der Immunisierungslösung	24
2.2.1.2	Immunisierung der Mäuse	24
2.2.2	Klinische Beurteilung der EAE.....	25
2.2.3	Einteilung der Versuchsgruppen	25
2.3	Gewebeasservation.....	26
2.3.1	Herstellung der Perfusionslösungen.....	26
2.3.2	Transkardiale Perfusion mit PFA und Glutaraldehyd.....	27
2.3.3	Gewebepräparation	27
2.4	Histologische Techniken	28
2.4.1	Epon-Einbettung	28
2.4.2	Anfertigung der Ultradünnschnitte	29
2.4.3	Kontrastierung der Ultradünnschnitte	30
2.4.4	Anfertigung der Semidünnschnitte	30
2.5	Histologische Quantifizierung.....	31

2.5.1	Lichtmikroskopie	31
2.5.2	Elektronenmikroskopie	32
2.6	Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder	32
2.6.1	Myelinpathologie	32
2.6.1.1	<i>g-Ratio</i>	33
2.6.2	Axonpathologie.....	35
2.6.2.1	Mito-Ratio	35
2.6.2.2	<i>NNND</i>	37
2.6.3	Art des Schadens.....	38
2.7	Statistische Analyse.....	38
3	Ergebnisteil I – Läsionsregion	39
3.1	Transition von akuter Inflammation zu chronischer Neurodegeneration ..	40
3.2	Myelinpathologie.....	42
3.2.1	In der Läsionsregion nahm das Ausmaß der Myelinpathologie zeitlich progredient zu	42
3.2.2	Die Art der Myelinpathologie war abhängig vom Krankheitsstadium	44
3.2.3	Eine Regeneration der Myelinscheide fand erst in der späten Phase der MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE statt	46
3.3	Axonschaden.....	48
3.3.1	Die axonale Dichte war bei MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäusen signifikant verringert im Gegensatz zu Kontrolltieren.....	48
3.3.2	Die Anzahl an lytischen Axonen war in allen Krankheitsphasen vergleichbar ..	50
3.3.3	Nicht alle der als „feine“ Axonpathologien beschriebenen Merkmale konnten bei EAE-Tieren vermehrt nachgewiesen werden.....	52
3.3.3.1	Die Kinetik „feiner“ Axonschädigung zeigte strangabhängige Unterschiede	52
3.3.3.2	Eine vergrößerte <i>inner tongue</i> war kein Indiz für axonalen Schaden.....	57
3.4	Art des Schadens	58

4	Ergebnisteil II – <i>NAWM</i>	61
5	Diskussion	64
5.1	Ultrastrukturelle Veränderungen in der Läsionsregion	64
5.1.1	Abhängigkeit der ZNS-Inflammation vom Krankheitsstadium	64
5.1.2	Zunahme der Myelinpathologie mit dem Krankheitsverlauf	64
5.1.3	Auftreten regenerativer Prozesse in fortgeschrittenen Krankheitsphasen	68
5.1.4	Erhebliche Verminderung der axonalen Dichte in allen Krankheitsphasen	70
5.1.5	Auftreten einer Degeneration der Axone bereits früh im Krankheitsverlauf und zu allen Krankheitszeitpunkten vermehrt	70
5.1.6	Strangabhängige Unterschiede in der Kinetik „feiner“ Axonpathologien	73
5.1.7	<i>Inner tongue</i> -Vergrößerung bei MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäusen und bei Kontrolltieren	74
5.1.8	Art des Schadens	75
5.1.8.1	Axonschaden als Folge von Demyelinisierung	75
5.1.8.2	Isolierter Axonschaden	76
5.1.9	Einfluss des klinischen Schweregrades der Erkrankung auf das Ausmaß der Neurodegeneration in der Läsionsregion	77
5.2	Ultrastrukturelle Veränderungen in der <i>NAWM</i>	78
5.3	Schlussfolgerung	81
6	Zusammenfassung	82
7	Summary	84
8	Literaturverzeichnis	86

9	Anhang	101
9.1	Danksagung	101
9.2	Publikationsliste	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1.	Untersuchte Bahnsysteme	12
Abb. 1-2.	Verschiedene Arten der Myelinpathologie	17
Abb. 1-3.	Remyelinisierung.	18
Abb. 1-4.	Ultrastrukturelle Merkmale einer Axonpathologie	19
Abb. 2-1.	Unterscheidung zwischen <i>NAWM</i> und Läsionsregion in methylenblau- gefärbten Semidünnschnitten	31
Abb. 2-2.	Berechnung der <i>g-Ratio</i>	33
Abb. 2-3.	Berechnung der <i>Mito-Ratio</i>	35
Abb. 3-2.	Die Myelinpathologie in der Läsionsregion zeigte einen progressiven Verlauf	44
Abb. 3-3.	Art der Myelinpathologie in der Läsionsregion verschiedener Bahnsysteme	45
Abb. 3-4.	Das Auftreten von Remyelinisierung war mit einem zeitlich weit vorangeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert	47
Abb. 3-5.	Die Gesamtanzahl an Axonen/mm ² in der Läsionsregion der weißen Substanz war bei MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäusen im Gegensatz zu nicht- immunisierten Kontrollmäusen signifikant niedriger	49
Abb. 3-6.	Das Auftreten lytischer Axone wurde als „grober“ Axonschaden gewertet und konnte in allen untersuchten Krankheitsphasen ermittelt werden	50
Abb. 3-7.	Das Ausmaß der Mitochondrienpathologie war im Ventrolateralstrang über die Zeit hinweg konstant, während im Dorsalstrang ein progressiver Anstieg ermittelt werden konnte.	55
Abb. 3-8.	Die Dichte der axonalen Neurofilamente war bei EAE-Tieren im Gegensatz zu Kontrollmäusen verringert, auch hier ließen sich jedoch strangabhängige Unterschiede feststellen	55
Abb. 3-9.	Eine Vergrößerung der <i>inner tongue</i> trat bei MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäusen nicht vermehrt auf	57

Abb. 3-10.	Isolierter Axonschaden trat in allen Krankheitsphasen der MOG ₃₅₋₅₅ - induzierten EAE auf.....	59
Abb. 4-1.	Die lichtmikroskopisch normal erscheinende weiße Substanz (<i>NAWM</i>) zeigte bei ultrastruktureller Analyse deutliche Anzeichen einer beginnenden Neurodegeneration	61

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1.	Definition der klinischen Scores bei der EAE.	25
Tab. 2-2.	Einteilung der Mäuse in Versuchsgruppen nach Krankheitsstadium	26
Tab. 2-3.	Verwendete Substanzen für die Epon-Einbettung.	28
Tab. 2-4.	Verwendete Lösungen für die Epon-Einbettung.....	29
Tab. 2-5.	Berechnung der <i>g-Ratio</i> aus gemessenen Werten der Kontrolltiere	34
Tab. 2-6.	Berechnung der <i>Mito-Ratio</i> aus gemessenen Werten der Kontrolltiere	36
Tab. 2-7.	Berechnung der <i>NNND</i> aus gemessenen Werten der Kontrolltiere	37
Tab. 3-1.	Anzahl Axone mit „feiner“ Mitochondrienpathologie.....	53
Tab. 3-2.	Art des Nervenfaserschadens in der Läsionsregion.	58
Tab. 4-1.	Ausgewertete Parameter zur Evaluation der Neurodegeneration bei Kontrolltieren sowie in der <i>NAWM</i> und der Läsionsregion MOG ₃₅₋₅₅ - immunisierter Mäuse.....	63

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ak	akute EAE
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
B6	C57BL/6
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
CCL20	CC-Chemokinligand 20
CCR6	CC-Chemokinrezeptor 6
CFA	<i>complete freund's adjuvant</i> (komplettes Freund-Adjuvant)
chron / chr	chronische EAE
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d. h.	das heißt
DDSA	Dodecenylnsteinsäureanhydrid
dem	vollständig demyelinisierte Nervenfasern
DMP	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
DS	Dorsalstrang (= <i>Funiculus dorsalis</i>)
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2)
g	Gramm
h	Stunde
IFA	<i>incomplete freund's adjuvant</i> (inkomplettes Freund-Adjuvans)

Verzeichnisse

iP	Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung
Ktrl	Kontrolle
kV	Kilovolt
LT	langzeit-chronische EAE
M	Molar
MAG	myelinassoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches Protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MNA	Methyl Nadic Anhydrid
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOG ₃₅₋₅₅	MOG Peptid 35-55
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
<i>NAWM</i>	<i>normal-appearing white matter</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
<i>NNND</i>	<i>nearest neighbour neurofilament distance</i>
NO	Stickstoffmonoxid

o.b.B.	ohne besonderen Befund
OPC	<i>oligodendrocyte precursor cell</i> (Oligodendrozyten-Vorläuferzelle)
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PLP ₁₇₈₋₁₉₁	PLP Peptid 178-191
PP-MS	primär-progrediente MS
PTX	Pertussistoxin
PY	Pyramidenbahn (= <i>Tractus corticospinalis dorsalis</i>)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RR-MS	<i>relapsing-remitting MS</i> (schubförmig-remittierende MS)
SP-MS	sekundär-progrediente MS
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
T _H 1	Typ1-T-Helferzelle
T _H 17	Typ17-T-Helferzelle
TMEV	Theiler's Maus Enzephalomyelitis Virus
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Zelle
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>very late activation antigen-4</i>
VLS	Ventrolateralstrang (= <i>Funiculus ventrolateralis</i>)
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Verlaufsformen

Die Multiple Sklerose (MS) gilt als Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und ist durch multizentrische Inflammation und Demyelinisierung charakterisiert. Bereits 1868 beschrieb Charcot diese histopathologischen Kennzeichen der *sclérose en plaques* (Charcot, 1868). Als häufigste neurologische Erkrankung mit bleibender Behinderung und vorzeitiger Berentung im jungen Erwachsenenalter (Sanders und De Keyser, 2007) steht die MS seither im Fokus großer Forschungsanstrengungen. Dennoch sind die zugrunde liegenden Pathomechanismen bis heute nicht vollständig geklärt.

Die Krankheit beginnt für gewöhnlich im zweiten bis vierten Lebensjahrzehnt (McFarlin und McFarland, 1982) und betrifft Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer (Ebers, 2008). Nach aktuellen Hochrechnungen liegt die Prävalenzrate in Deutschland bei 150 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner, dies entspricht einer Gesamtzahl von etwa 122.000 Erkrankten (Hein und Hopfenmüller, 2000). Es gibt zwei hauptsächliche Verlaufsformen der MS. (1) Mit etwa 85 bis 90 % leidet ein Großteil der Patienten an der schubförmig-remittierenden MS (RR-MS), bei der sich die Symptome über einige Tage entwickeln, ein stabiles Plateau bilden und schließlich über Wochen wieder abklingen. Während der Schübe spricht der Körper zunächst recht gut auf Kortikosteroide an, die Wirksamkeit nimmt allerdings mit der Zeit ab. Zwischen den Schüben kommt es zu einer Besserung der Symptomatik, jedoch erholen sich nicht alle Patienten vollständig. Nach einigen Jahren entwickeln die meisten dieser Patienten (etwa 70 %) sekundär-progrediente MS (SP-MS) und leiden unter einer fortschreitenden Verschlechterung der neurologischen Fähigkeiten (Noseworthy et al., 2000). (2) Bei etwa 10 bis 15 % der MS-Patienten kommt es im Rahmen der primär-progredienten MS (PP-MS) schon von Krankheitsbeginn an zu einer progressiven Abnahme der neurologischen Fähigkeiten und ständigem Krankheitsfortschritt (Sospedra und Martin, 2005).

Die Symptome der MS sind vielfältig und abhängig von der Lokalisation der aktiven Herde im ZNS. Neben Parästhesien, spastischen Lähmungen, zerebellären Symptomen, Sensibilitäts-, Miktions- und Defäkationsstörungen kommt es fast immer zu einer

Beeinträchtigung der vorderen Sehbahn, so dass die Patienten im Rahmen einer Optikusneuritis unter schmerzhaften Sehstörungen leiden. Weiterhin können auch psychische Symptome wie chronische Fatigue und progressive Demenz sowie kognitive Defizite dem Krankheitsbild der MS zugeschrieben werden (Compston und Coles, 2008).

1.1.2 Pathogenese der MS

Die Pathogenese der MS umfasst die drei pathologischen Prozesse Inflammation, Demyelinisierung und Axonschaden. Allgemein wird davon ausgegangen, dass in der Peripherie aktivierte, autoreaktive CD4⁺ T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überqueren und so ihre Effektorfunktion im eigentlich immunprivilegierten ZNS ausüben können (Sospedra und Martin, 2005).

1.1.2.1 Inflammation

Ein möglicher Mechanismus für die Entstehung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie ist die so genannte *molecular mimicry* (Fujinami und Oldstone, 1985). Bei dieser Theorie geht man davon aus, dass Moleküle auf der Oberfläche von Krankheitserregern körpereigenen Molekülen ähneln oder sogar mit diesen identisch sind. Wenn diese Antigene durch das Immunsystem erkannt werden, kann sich die darauf folgende Immunantwort nicht nur gegen den Erreger selbst, sondern auch gegen körpereigenes Gewebe richten (Wucherpfennig und Strominger, 1995). Ein Großteil der in der MS vorkommenden, autoreaktiven T-Zellen scheint durch den Prozess der *molecular mimicry* neu zu entstehen (*in vivo* Priming) (Wucherpfennig, 2001). Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass im Organismus natürlicherweise vorkommende, potentiell autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion im Thymus entgehen, ein Schritt, der auch bei gesunden Menschen vorkommt (Viglietta et al., 2004). Während diese autoreaktiven T-Zellen beim Gesunden jedoch durch regulatorische T-Zellen (Tregs) abgefangen werden, scheint diese Funktion der Tregs bei MS-Patienten gestört zu sein (Viglietta et al., 2004). Die auf diese Weise entstandenen, autoreaktiven T-Zellen können nun wiederum durch den Mechanismus der *molecular mimicry* aktiviert werden (Wucherpfennig, 2001). Ein weiterer möglicher Mechanismus für die Entstehung autoreaktiver T-Zellen ist die so genannte *bystander activation* (Duke, 1989). Das im Rahmen einer viralen oder bakteriellen Infektion vorherrschende entzündliche Milieu kann durch Aktivierung von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) zu einer gesteigerten

Antigenprozessierung und Präsentation von bereits vorhandenen Selbstantigenen führen. Durch die *bystander activation* führt dieses inflammatorische Milieu zu einer Steigerung der Anzahl und zur antigenunabhängigen Aktivierung bereits vorhandener autoreaktiver Lymphozyten (Fujinami et al., 2006; Wucherpfennig, 2001). Ein weiterer Mechanismus, vor allem in chronischen Krankheitsphasen, ist das *determinant spreading*, bei dem die Immunreaktion im Verlauf der Krankheit nicht auf eine einzige immundominante Determinante beschränkt bleibt, sondern sich auch auf andere Determinanten innerhalb desselben oder eines anderen Proteins ausbreiten und dadurch zu einer Diversifikation der Immunantwort führen kann (Lehmann et al., 1992).

Unter physiologischen Bedingungen verhindert die BHS den Übertritt von Zellen und Molekülen aus dem zirkulierenden Blut ins ZNS Parenchym, so dass im Gehirn ein besonderes immunologisches Milieu herrscht und nur wenige Immunzellen vorhanden sind (Hickey, 2001). Bei MS-Patienten wird die BHS für Immunzellen und humorale Faktoren durchlässig, so dass eine Transmigration der autoreaktiven T-Zellen ins ZNS stattfinden kann (Minagar und Alexander, 2003). Als mögliche Mechanismen wurden neben dem Auftreten abnormaler *tight junctions* (Plumb et al., 2002) und der Expression des lymphotaktischen CC-Chemokinrezeptor 6 (CCR6)-Liganden CCL20 im Epithel des Plexus choroideus (Reboldi et al., 2009) unter anderem eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie VLA-4/VCAM-1 (Yednock et al., 1992; Kent et al., 1995) sowie eine Spaltung der BHS durch Matrix-Metalloproteinasen identifiziert (Kieseier et al., 1998). Im ZNS werden die autoreaktiven T-Zellen durch APZ reaktiviert und erkennen Oligodendrozyten und Neurone fälschlicherweise als körperfremd (Sospedra und Martin, 2005). Sie proliferieren durch klonale Expansion (Scholz et al., 1998) und lösen eine lokale Entzündungsreaktion aus, die die Öffnung der BHS zur Folge hat (Minagar und Alexander, 2003). Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine werden residente Astrozyten und Mikroglia aktiviert, sowie zahlreiche weitere Entzündungszellen aus dem peripheren Blut rekrutiert, darunter Monozyten/Makrophagen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Mastzellen (Sospedra und Martin, 2005). Es kommt zur Produktion löslicher Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) (Encinas et al., 2005) und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Steinman, 1996; Bagasra et al., 1995) durch aktivierte Makrophagen/Mikroglia und schließlich zur Schädigung von Myelinscheiden und Axonen (Sospedra und Martin, 2005; Trapp et al., 1998).

1.1.2.2 Demyelinisierung

Im Rahmen der Autoimmunreaktion können verschiedene ZNS-Antigene als körperfremd erkannt und von den eingewanderten Effektorzellen angegriffen werden – neben den Myelinantigenen Myelin-Basisches Protein (MBP), Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), myelinassoziertes Glykoprotein (MAG) (Sospedra und Martin, 2005), Galactocerebroside (Menge et al., 2005) auch andere neuronale Strukturen, wie Neurofilamente (Ehling et al., 2004; Silber et al., 2002) oder das Neurofascin, welches an Ranvierschen Schnürringen exprimiert wird (Mathey et al., 2007). Andere Mechanismen, die zu einer Myelinschädigung führen können, umfassen aktivierte Komplementfaktoren (Mead et al., 2002; Storch et al., 1998), zytotoxische Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Hofman et al., 1989; Selmaj et al., 1991), spezifische demyelinisierende Antikörper (Storch et al., 1998) sowie die bereits beschriebenen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Steinman, 1996; Bagasra et al., 1995). Die beschriebenen Vorgänge führen letztlich zur Ausbildung der neurodegenerativen „Plaques“, wobei die Läsionen verschiedener Patienten eine große interindividuelle Heterogenität der pathologischen Befunde aufweisen (Lucchinetti et al., 2000). Lediglich die Zusammensetzung des inflammatorischen Infiltrats aus Lymphozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen bleibt konstant (Lucchinetti et al., 2000). Histopathologisch können mit den so genannten *Lucchinetti patterns* vier verschiedene Schädigungsmuster voneinander abgegrenzt werden (Lucchinetti et al., 2000; Lassmann et al., 2001): in Läsionen der Kategorie I sind Myelinschädigungen hauptsächlich durch T-Zellen und Makrophagen vermittelt, während Läsionen der Kategorie II durch Ablagerung von Immunglobulinen und Bestandteilen des Komplementsystems gekennzeichnet sind; beide Kategorien ähneln sich im Auftreten scharf abgegrenzter perivaskulärer Läsionen sowie in der verhältnismäßig geringen Beeinträchtigung der Oligodendrozyten und spiegeln die gängige Auffassung autoimmuner Demyelinisierung wider; Läsionen der Kategorie III zeichnen sich durch einen hauptsächlich Verlust von MAG sowie eine massive Apoptose von Oligodendrozyten aus und weisen auf eine Oligodendrozytendystrophie als Ursache der Demyelinisierung hin; charakteristisch für Läsionen der Kategorie IV ist die Degeneration von Oligodendrozyten in einem schmalen Gebiet an der Grenze zur Läsion in der normal erscheinenden weißen Substanz, wobei dieser Typ sehr selten auftritt und weder sein tatsächliches Vorhandensein, noch seine Ursache abschließend geklärt sind (Lucchinetti et al., 2000).

1.1.2.3 Axonschaden

Lange Zeit befassten sich pathologische Studien der MS ausschließlich mit Mechanismen der Inflammation und Demyelinisierung. Dabei wurde bereits in frühesten Beschreibungen über die Bedeutung des Axonschadens als Bestandteil von MS-Läsionen gemutmaßt. Der deutsche Neuropathologe Carl Frommann beschrieb 1878 neben Unterbrechungen der Myelinscheide auch „Continuitätstrennungen der Axenzylinder“ sowie die „in großer Häufigkeit auftretenden Varikositäten“ als Kennzeichen von MS-Läsionen. Knapp dreißig Jahre später fand der österreichische Neurologe Otto Marburg heraus, dass die „Achsenzylinder relativ intakt bleiben“, betonte aber gleichzeitig die Bedeutung des Wortes „relativ“: „Der Ton in diesem Satze liegt aber nicht nur auf intakt, sondern auch auf relativ. Denn es drängt sich immer mehr die Tatsache hervor, daß bei der multiplen Sklerose mehr Achsenzylinder zugrunde gehen, als man gemeinhin dachte“ (zusammengefasst in Kornek und Lassmann, 1999). Trotzdem dauerte es noch fast ein ganzes Jahrhundert, ehe die Bedeutung des Axonschadens als Bestandteil von MS-Läsionen in den späten 1990er Jahren durch die Arbeitsgruppen um Trapp und Ferguson wiederentdeckt wurde (Trapp et al., 1998; Ferguson et al., 1997). Die Gruppe um Trapp et al. beschrieb in ihrer Studie das Auftreten von Axontransektionen (d. h. Durchtrennungen des Axons, bei denen das verletzte Ende anschwillt und eine beulenartige Verdickung – den so genannten *axon end bulb* – ausbildet, während das distale Ende versiegelt wird) als häufiges Merkmal von MS-Läsionen (Trapp et al., 1998). Dabei gingen sie davon aus, dass die Schädigung der Axone stets als Konsequenz von Inflammation und konsekutiver Demyelinisierung auftritt (Trapp et al., 1998). Diese Annahme liegt durchaus nahe, bedenkt man die schützenden und trophischen Funktionen, die der Oligodendrozyt dem Axon gegenüber wahrnimmt, sowie die Tatsache, dass ein Verlust der Myelinscheide zu erheblichen Störungen der saltatorischen Reizweiterleitung im Axon führt (Neumann et al., 2003; Wilkins et al., 2003). Neuere histopathologische Untersuchungen zeigen jedoch, dass bereits in sehr frischen Läsionen aus biopsiertem Hirngewebe von MS-Patienten Axonschädigungen vorkommen (Bitsch et al., 2000), ein Befund, der in MRS-Studien bestätigt wurde (De Stefano et al., 2002). Eine Schädigung der Axone scheint somit bereits früh im Krankheitsverlauf der MS aufzutreten und damit, zumindest teilweise, in Abwesenheit von Inflammation und Demyelinisierung.

1.2 Tiermodelle der MS

Obwohl im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung handelt, die in genetisch empfänglichen Menschen auftritt und zusätzlich durch Umweltfaktoren begünstigt wird, bleiben die zugrunde liegenden Pathomechanismen trotz immenser Forschungsanstrengungen bis heute unverstanden. Pathogenetische Studien am Menschen stützen sich auf ZNS-Biopsien lebender Patienten bzw. auf Hirngewebe aus Obduktionen verstorbener Patienten und stellen somit stets nur eine Momentaufnahme dar. Einzig MRT-/MRS-Studien bieten die Möglichkeit, die Läsionsformation im ZNS longitudinal zu verfolgen, erlauben jedoch nicht die Untersuchung der pathogenetischen Mechanismen, die der Läsionsformation zugrunde liegen. Für die Grundlagenforschung sind Tiermodelle daher unerlässlich, um die Entstehung und Entwicklung der pathologischen Läsionen im Zeitablauf verfolgen zu können.

Die drei wichtigsten Tiermodelle der MS sind die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), das Cuprizone-Modell sowie Infektion mit dem Theiler-Virus (Denic et al., 2011). Die Verabreichung des Toxins Cuprizone führt zunächst zu einem nahezu vollständigen Verlust der Myelinscheide, später erfolgt eine Neubildung des Myelins (Blakemore, 1973; Ludwin, 1978). Inflammatorische Infiltrate sowie eine Beeinträchtigung der Axone fehlen jedoch vollständig (Kipp et al., 2009). Aus diesem Grund und aufgrund der fehlenden Autoimmunkomponente ist dieses Modell relativ weit von der MS entfernt, eignet sich aber für generelle Studien über De- und Remyelinisierung (Matsushima und Morell, 2001). Das Theiler-Modell wird durch intrazerebelläre Inokulation mit dem Theiler's Maus Enzephalomyelitis Virus (TMEV) induziert (Theiler, 1937) und führt bei empfänglichen Maus-Stämmen zu einer biphasischen Autoimmunreaktion im ZNS (Dal Canto et al., 1996). Während die akute Phase durch Apoptose von Neuronen in der grauen Substanz charakterisiert ist, infiziert das Virus während der chronischen Phase Gliazellen und Makrophagen und führt so zu einer inflammatorischen Demyelinisierung und Axondegeneration in der weißen Substanz des Rückenmarks (Oleszak et al., 2004; Tsunoda und Fujinami, 2010).

In der vorliegenden Studie wurde das EAE-Modell verwendet, welches bei den Versuchstieren entweder durch aktive Immunisierung mit Myelinantigenen oder über den passiven Transfer von myelinreaktiven T-Zellen induziert werden kann (Wekerle et al., 1994). Klinisch ist die EAE durch eine aufsteigende Paralyse gekennzeichnet. Die ZNS-

Histopathologie der EAE-erkrankten Tiere spiegelt mit dem Vorhandensein von Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigungen die der MS zugrunde liegenden pathogenetischen Prozesse wider (Gold et al., 2006). Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber der rein demyelinisierenden Cuprizone-induzierten Erkrankung dar. Weiterhin wird bei der EAE als MS-Modell auch die Autoimmunkomponente der menschlichen Erkrankung berücksichtigt, während die Infektion mit dem TMEV lediglich die mögliche, aber nicht gesicherte, Virusätiologie der MS erfasst. Schließlich eignet sich das EAE-Modell besonders für Studien über die Entwicklung der ZNS-Pathologie über die Zeit, da sie durch ein bekanntes Antigen gezielt induziert wird und somit der genaue Zeitpunkt der Krankheitsinduktion bekannt ist.

1.3 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

1.3.1 Geschichte der EAE

Die EAE ist das am häufigsten verwendete Tiermodell der MS (Goverman und Brabb, 1996; Mix et al., 2008; Krishnamoorthy und Wekerle, 2009). Ihre Ursprünge reichen bis ins Jahr 1885 zurück, als Louis Pasteur die erste Tollwutimpfung entwickelte. Nach Inokulation des Virus in Kaninchen entnahm er das Rückenmark der infizierten Tiere, trocknete es über mehrere Tage und verabreichte es schließlich seinen Patienten. Obwohl die Impfung gute Erfolge erzielte, traten schon nach kurzer Zeit die ersten Fälle postvazinaler Lähmungserscheinungen auf. Einige Impflinge wiesen lediglich leichte Paralysen einzelner Muskeln auf, andere jedoch zeigten eine aufsteigende Paralyse, die von den Beinen, über die Arme und den Nacken bis hin zu Schluck- und Atembeschwerden reichte und eine Mortalität von bis zu 30 % bedingte. In den 1930er Jahren untersuchte Thomas Rivers den Mechanismus dieser unerwünschten Begleiterscheinung, indem er Kaninchen und Rhesusaffen mit ZNS-Homogenisat immunisierte. Histologisch war die induzierte Enzephalomyelitis durch perivaskuläre Infiltrate und Demyelinisierung im ZNS charakterisiert. Nach der Entdeckung ZNS-spezifischer Antikörper lag die Vermutung nahe, dass die Demyelinisierung durch eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden könnte. Durch Beimengung von Paraffinöl zum ZNS-Homogenisat konnte die lokale Antikörperproduktion sowie die T-Zell-Antwort verstärkt werden: waren vorher bis zu 80 Injektionen nötig, um Symptome auszulösen, so

konnte die EAE nun zuverlässig mit nur einigen wenigen Injektionen induziert werden (zusammengefasst in Baxter, 2007).

1.3.2 Induktion der EAE

Seit diesen ersten Studien durch Rivers wurde die EAE in vielen Tierarten etabliert, so etwa in Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Hühnern, aber auch in Ziegen, Schafen und Marmosetten. Heutzutage wird die Mehrheit der Studien in verschiedenen Mausstämmen durchgeführt. Für die subkutane Immunisierung der Tiere werden neben dem ursprünglich gebrauchten ZNS-Homogenisat vor allem verschiedene Myelin-Proteine und -Peptide verwendet. Auch heute noch werden die Antigene vor der Verabreichung in Adjuvantia emulgiert, wobei das bereits zu Rivers' Zeiten gebrauchte komplette Freund-Adjuvans (CFA) aus Paraffinöl und abgetötetem *Mycobacterium tuberculosis* am häufigsten verwendet wird (Gold et al., 2006). Das abgetötete *Mycobacterium tuberculosis* führt dabei zur Ausbildung einer proinflammatorischen Immunantwort, die vor allem durch T_H1-, aber auch durch T_H17-Lymphozyten vermittelt wird (Smith et al., 2011). Eine gleichzeitige Verabreichung von Pertussistoxin (PTX) fördert die Krankheitsinduktion und führt zu einem aggressiveren Verlauf der murinen EAE (Hofstetter et al., 2002). Neben dieser aktiven Immunisierung der Tiere (aktive EAE) gibt es auch passive EAE-Modelle: dabei werden immunisierten Mäusen autoreaktive, myelinspezifische T-Zellen entnommen und durch adoptiven Transfer in naive Tiere übertragen (Ben-Nun et al., 1981; Stromnes und Goverman, 2006). Die passive EAE gilt als Beweis für die Beteiligung autoimmuner Mechanismen an der EAE und ermöglicht Studien über den pathologischen Einfluss einzelner Zelllinien (Gold et al., 2006).

Schließlich gibt es auch spontane EAE-Modelle, bei der die Tiere aufgrund transgener T-Zell-Rezeptoren ohne eine vorherige aktive oder passive Immunisierung Symptome entwickeln (Berer et al., 2011). Der Vorteil dieser Modelle liegt in der größeren Ähnlichkeit zur MS, da auch die menschliche Erkrankung spontan auftritt und die spontanen EAE-Modelle ohne die Verwendung immunmodulierender Zusätze wie CFA auskommen (Batoulis et al., 2011). Weiterhin zeigen die spontan erkrankten Tiere häufig atypische Symptome wie Tremor oder Ataxie, die den Symptomen von MS-Patienten näher kommen als die schlaffe Paralyse der „klassischen“ EAE (Domingues et al., 2010; Muller et al., 2005; Stromnes et al., 2008). Andererseits bedingt das spontane Auftreten der Erkrankung eine verminderte Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da der Zeitpunkt der Krankheitsentstehung im

Gegensatz zur „klassischen“ EAE (Immunisierung der Mäuse bzw. T-Zell-Transfer) nicht bekannt ist (Berer et al., 2011). Außerdem werden durch die Verwendung transgener Tiere künstliche Versuchsbedingungen geschaffen, da im Gegensatz zur Situation beim MS-Patienten gewisse Funktionen des Immunsystems ausgeschaltet oder verstärkt werden und somit nicht die gesamte Palette des Immunsystems zum Tragen kommt (Batoulis et al., 2011).

Aufgrund unterschiedlicher Kombinationen aus Tierart bzw. genetischem Hintergrund des Tierstammes, dem für die Immunisierung verwendeten Antigen, sowie der Art und Weise der EAE-Induktion (aktiv oder passiv) können jeweils spezifische Aspekte der MS-Pathologie mit dem geeigneten EAE-Modell dargestellt werden (Kuerten und Angelov, 2008). Dabei unterscheiden sich die einzelnen Modelle nicht nur in der Beteiligung verschiedener Effektorzellen und der resultierenden ZNS-Histopathologie (Kuerten et al., 2008), sondern auch in ihrem klinischen Verlauf (Hofstetter et al., 2002; Kuerten et al., 2007; Mendel et al., 1995; Waxman et al., 1980). Je nach Tierstamm-Antigen-Kombination können die klinischen Symptome schubförmig-remittierend (Hofstetter et al., 2002), monophasisch (Waxman et al., 1980) oder chronisch (Mendel et al., 1995) auftreten, ähnlich der verschiedenen Verlaufsförmigkeiten der MS. Die Tiere zeigen dabei eine aufsteigende, schlaffe Paralyse, die sich vom Schwanz über die Hinterläufe bis hin zu den Vorderläufen (Tetraplegie) ausbreiten kann (Gold et al., 2006). Insgesamt ist die EAE ein überaus nützliches Hilfsmittel, um grundlegende Mechanismen der ZNS-Inflammation sowie immunpathologische Prozesse, die zu einer Zerstörung von ZNS-Gewebe führen, über die Zeit verfolgen zu können. Die Komplexität der MS kann durch die EAE allerdings nur wiedergegeben werden, wenn ein großes Spektrum an Modellen – in verschiedenen Spezies und mit verschiedenen Induktionstechniken – verwendet wird. Dabei spiegelt jedes EAE-Modell gewisse Aspekte der MS-Pathogenese wider (Kuerten und Angelov, 2008).

1.4 Histopathologie der C57BL/6-EAE

Für pathogenetische Studien ist der C57BL/6 (B6) Stamm von besonderer Bedeutung, da die meisten genmodifizierten Mäuse auf diesem Hintergrund generiert werden. Diese genmodifizierten Knock-Out- oder Knock-In-Mäuse, die spezifische aussichtsreiche Moleküle exprimieren (oder eben nicht), sind heutzutage unerlässlich, um in mechanistischen Studien die Auswirkung einzelner Moleküle näher erforschen zu können. Bevor jedoch der Einfluss einzelner Mechanismen auf bestimmte Pathogeneseschritte an genmodifizierten Tieren untersucht werden kann, bedarf es einer grundsätzlichen Charakterisierung der zugrunde liegenden pathologischen Komponenten des jeweiligen Modells.

Für die Immunisierung von B6-Mäusen werden üblicherweise das MOG Peptid 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) (Bernard et al., 1997; Mendel et al., 1995; Oliver et al., 2003), das PLP Peptid 178-191 (PLP₁₇₈₋₁₉₁) (Tompkins et al., 2002; Kuerten et al., 2006), sowie das relativ neu entwickelte MP4 – ein Fusionsprotein aus MBP und PLP (Kuerten et al., 2006) – verwendet. Der Vorteil von Studien an einem einzigen Mausstamm liegt in der Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse: da alle Tiere auf demselben genetischen Hintergrund generiert und unter identischen Umweltfaktoren gehalten werden, müssen Unterschiede in den Ergebnissen mit dem für die Immunisierung verwendeten Antigen zusammenhängen.

1.4.1 Unterschiede in ZNS-Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigung

Bereits in früheren Studien haben wir uns mit den Unterschieden in der ZNS-Histopathologie zwischen verschiedenen B6-EAE-Modellen beschäftigt. Dabei haben wir die drei pathologischen Kennzeichen der MS – Inflammation, Demyelinisierung und Axonschaden – in der MOG₃₅₋₅₅-, PLP₁₇₈₋₁₉₁- und MP4-induzierten EAE untersucht. Während sich die drei Modelle in der Klinik gleichen und zu einem schweren, chronischen Verlauf der EAE führen, konnten histopathologisch erhebliche Unterschiede nachgewiesen werden (Kuerten et al., 2007; 2008; 2011). (1) Die zelluläre Zusammensetzung der inflammatorischen Infiltrate veränderte sich in der MP4-induzierten EAE im Verlauf der Erkrankung, in den ZNS-Läsionen MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse konnte hingegen kein Unterschied zwischen der akuten und der chronischen Phase der Erkrankung festgestellt werden (Kuerten et al., 2007; 2008). In der akuten EAE herrschten in beiden Modellen CD4⁺ T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen vor und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen waren nur zu einem geringen

Prozentsatz vorhanden. Während dieses Verteilungsmuster für die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE auch drei Monate nach Krankheitsbeginn noch gültig war, zeigten die MP4-immunisierten Mäuse nun eine deutliche Zunahme an CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen sowie eine Zusammenlagerung der B-Zellen in Lymphfollikel-ähnliche Strukturen (Kuerten et al., 2008). Für die PLP₁₇₈₋₁₉₁-induzierte EAE konnte kein spezifisches Muster der ZNS-Infiltration aufgezeigt werden (Kuerten et al., 2008). (2) Ein Verlust der Myelinscheide wurde immunhistochemisch mittels Antikörpern gegen MBP (SMI-99) untersucht und konnte sowohl im ZNS MOG₃₅₋₅₅- als auch MP4-immunisierter Mäuse nachgewiesen werden. Während die Demyelinisierung im MP4-Modell jedoch einen chronischen Verlauf nahm und über die Zeit hinweg konstant blieb, kam es in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE in der chronischen Phase der Erkrankung zu einer Abnahme der Myelinpathologie (Kuerten et al., 2011). Im PLP₁₇₈₋₁₉₁-Modell konnte Demyelinisierung zu keiner Zeit nachgewiesen werden (Kuerten et al., 2011). (3) Axonpathologien wurden ebenfalls immunhistochemisch mittels Antikörpern gegen nichtphosphoryliertes Neurofila-ment (SMI-32) evaluiert. Während die drei Modelle in der Zusammensetzung der inflammatorischen Infiltrate sowie bezüglich der Myelinpathologie erhebliche Unterschiede zeigten, war das Ausmaß der Axonschädigung in allen drei Modellen vergleichbar. Dabei konnten sowohl in der akuten, als auch in der chronischen EAE pathologische Axone nachgewiesen werden (Kuerten et al., 2011). Mit dem Fortschritt der Erkrankung nahm auch das Ausmaß der Axonpathologie zu, allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz (Kuerten et al., 2011). Somit könnte eine Axonschädigung als morphologisches Korrelat für die gleichbleibenden, chronischen Defizite der Mäuse gelten – unabhängig vom verwendeten Antigen.

Auch bei MS-Patienten korreliert das Ausmaß der Axondegeneration mit der Schwere der klinischen Defizite (De Stefano et al., 1998; Trapp et al., 1998; Ferguson et al., 1997) und ist mit dem Auftreten irreversibler Behinderungen assoziiert, besonders in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (De Stefano et al., 2003).

1.4.2 Unterschiede in der Schädigung verschiedener ZNS-Bahnsysteme

Zusätzlich zur immunhistochemischen Untersuchung haben wir uns anhand methylenblaugefärbter Semidünnschnitte auch lichtmikroskopisch mit der Evaluation der ZNS-Histopathologie beschäftigt (Kuerten et al., 2011; Recks et al., 2011a). Dabei lag das Augenmerk vor allem auf der Analyse verschiedener Bahnsysteme: (1) der Ventrolateralstrang (*Funiculus ventrolateralis*), der den größten Anteil der weißen Substanz ausmacht, und der Nozizeption, der Temperaturwahrnehmung sowie der groben Mechanorezeption dient (Nickel et al., 2004); (2) der Dorsalstrang (*Funiculus dorsalis*), der zwischen den Hinterhörnern der grauen Substanz lokalisiert ist und für die Weiterleitung von Impulsen der epikritischen (Wahrnehmung von Druck-, Berührungs- und Vibrationsreizen) und propriozeptiven Sensibilität zuständig ist (Nickel et al., 2004); (3) der *Tractus corticospinalis dorsalis* der Pyramidenbahn, der bei den Rodentia gut abgegrenzt zwischen dem ventralen Teil des Dorsalstrangs und der grauen Substanz liegt (Steward et al., 2004; Terashima et al., 1995) (Abb. 1-1). Die Pyramidenbahn dient der Weiterleitung von Impulsen der Willkürmotorik, spielt jedoch beim Tier nicht die dominierende Rolle wie beim Menschen (Nickel et al., 2004).

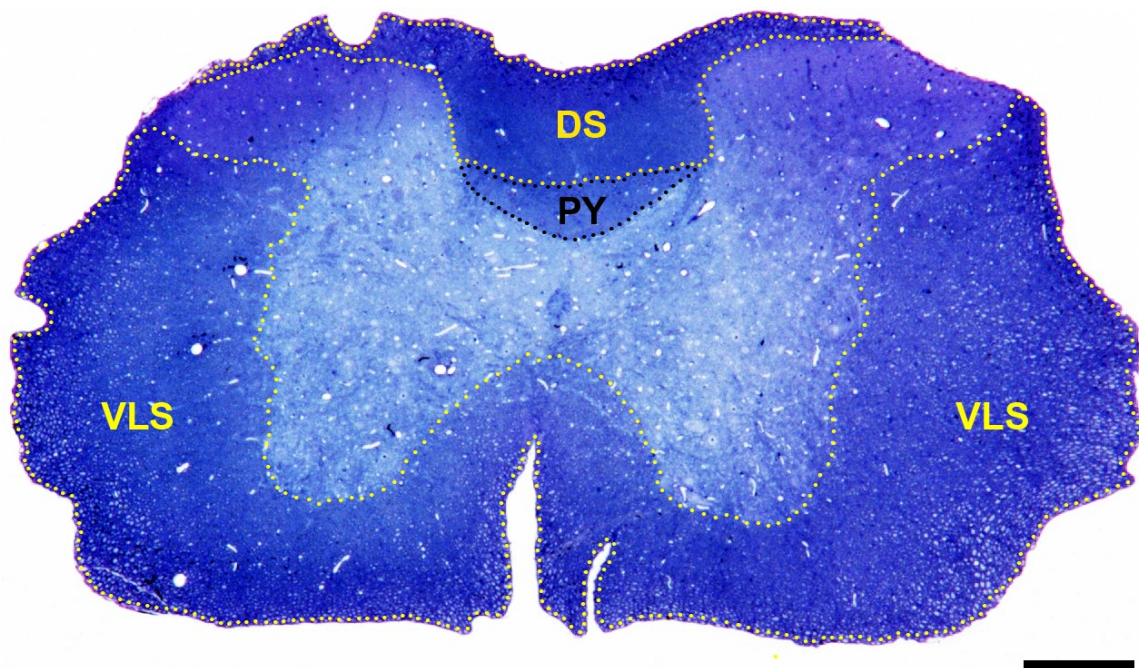


Abb. 1-1. Untersuchte Bahnsysteme. Lokalisation der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bahnsysteme im Lichtmikroskop (Semidünnschnitt). **VLS:** Ventrolateralstrang, **DS:** Dorsalstrang, **PY:** Pyramidenbahn (*Tractus corticospinalis dorsalis*). Die Maßstabsleiste zeigt 200 μ m.

Der Ventrolateralstrang war in allen drei Modellen, bei allen Mäusen und in jeder Phase der Erkrankung betroffen. Während dies in der MOG₃₅₋₅₅- und MP4- induzierten EAE auch auf den Dorsalstrang zutraf, war das Rückenmarksgewebe dieses Bahnsystems in der PLP₁₇₈₋₁₉₁-induzierten EAE lediglich in der chronischen Phase der Erkrankung pathologisch (Kuerten et al., 2011). Besonders deutliche Unterschiede wurden in der lichtmikroskopischen Evaluation der Pyramidenbahnpathologie erreicht: während MP4-immunisierte Mäuse zu keiner Zeit eine Pathologie dieses Bahnsystems zeigten, konnte für die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE bei 75 % der Mäuse in der akuten Phase der EAE bzw. bei 25 % der Mäuse in der chronischen Phase der EAE eine Pathologie festgestellt werden. Die PLP₁₇₈₋₁₉₁-induzierte EAE wies mit 60 % Pathologien in der akuten Phase sowie mit 30 % in der chronischen Phase ein ähnliches Ausmaß an Pyramidenbahnpathologien auf (Kuerten et al., 2011).

Insgesamt konnten trotz einiger Gemeinsamkeiten doch erhebliche Unterschiede in der Histopathologie der drei EAE-Modelle gefunden werden. Daher sollten in Folgestudien die histopathologischen Charakteristika der drei Modelle im Einzelnen näher betrachtet werden. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns zunächst auf die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE als „klassisches“ EAE-Modell fokussiert, weitere eingehende Studien zur MP4- und PLP₁₇₈₋₁₉₁-induzierten EAE sind jedoch bereits in Arbeit.

1.5 MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE der B6-Maus

Die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE der B6-Maus stellt eines der am besten etablierten und von den meisten Arbeitsgruppen verwendeten EAE-Modelle dar (Ben-Nun et al., 2006). Daher haben wir uns in einer weiteren Arbeit näher mit den lichtmikroskopischen Merkmalen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE beschäftigt (Recks et al., 2011a).

1.5.1 MOG

MOG stellt mit 0,05 - 0,1 % aller Myelinproteine lediglich einen Bruchteil der Bestandteile der Myelinscheide dar (Johns und Bernard, 1999). Es wird von myelinisierenden Oligodendrozyten in der späten Phase der Myelinogenese an der Oberfläche der Oligodendrozyten sowie auf der äußersten Lamelle der ausgebildeten Myelinscheide exprimiert (Johns

und Bernard, 1999). MOG gehört zur Familie der integralen Membranproteine und besitzt einen extrazellulär gelegenen Anteil, der in seiner Struktur der variablen Domäne der Immunglobuline ähnelt (della Gaspera et al., 1998; Johns und Bernard, 1999; Pham-Dinh et al., 1993). Bei MS-Patienten stellt MOG eines der entscheidenden, ZNS-spezifischen Autoantigene für eine primäre Demyelinisierung dar; in der EAE spielt es eine wichtige Rolle in der Entwicklung demyelinisierender Läsionen (Clements et al., 2003). Vor allem das Peptid MOG₃₅₋₅₅ ist in der Lage, sowohl im ZNS verschiedener Spezies, als auch im ZNS verschiedener Mausstämmen eine beachtliche entzündliche und demyelinisierende Immunantwort auszulösen (Clements et al., 2003).

1.5.2 Lichtmikroskopische Charakteristika der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

1.5.2.1 Abhängigkeit der ZNS-Histopathologie vom Krankheitsstadium

In Anlehnung an die lichtmikroskopische Vergleichsstudie konnten auch in der MOG₃₅₋₅₅-Studie zu allen Krankheitszeitpunkten ausgedehnte Läsionen im Ventrolateral- und Dorsalstrang der MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäuse nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den Krankheitsstadien konnten lediglich in der Art der Pathologie festgestellt werden. Gewebe aus der akuten Phase der EAE zeigte ein beträchtliches Ausmaß an Inflammation und Ödematisierung. Mit dem Fortschritt der Erkrankung verschwanden diese Anzeichen einer akuten Entzündung und es kam zu einer stetigen Zunahme an Myelin- und Axonpathologien (Recks et al., 2011a). Übereinstimmend lassen sich auch bei den meisten MS-Patienten histologisch, aber auch klinisch (im Gegensatz zur chronischen Klinik der Mäuse), zwei verschiedene Phasen der Erkrankung abgrenzen. Im Anfangsstadium der MS ist die ZNS-Histopathologie durch inflammatorisch-demyelinisierende Läsionen gekennzeichnet, die jedoch, zumindest teilweise, noch reversibel zu sein scheinen und so die schubförmig-remittierende Klinik der Patienten bedingen. Später treten fast alle Patienten in ein sekundär-progredientes Stadium mit irreversiblen klinischen Defiziten ein, welches histologisch durch eine stetige Zunahme an Axonpathologien charakterisiert ist (Lassmann et al., 2007; Sospedra und Martin, 2005; Trapp et al., 1998; Trapp, 2004).

1.5.2.2 Bestimmung des klinischen Scores durch das Ausmaß der ZNS-Läsionen

Während das Krankheitsstadium der Mäuse die Art der ZNS-Histopathologie bedingte (akute Inflammation, chronische Neurodegeneration), korrelierte das Ausmaß der ZNS-Läsionen mit

dem klinischen Score der jeweiligen Maus. Mäuse mit einem niedrigen klinischen Score (Schwanzparese ohne Parese der Gliedmaßen) zeigten vereinzelt kleine, gut abgegrenzte Läsionen in der ansonsten normal erscheinenden weißen Substanz (*normal-appearing white matter*, *NAWM*) des Ventrolateral- und Dorsalstrangs. Bei Mäusen mit ausgeprägten Paralyse der Hinter- und z.T. auch der Vorderläufe hingegen erschien fast die gesamte weiße Substanz mit Ausnahme der Pyramidenbahn pathologisch (Recks et al., 2011a).

Deutliche Abweichungen zur ersten Studie wurden in der Pyramidenbahnanalyse offenkundig: während in der Vergleichsstudie ein Großteil der Mäuse eine Pathologie dieses Bahnsystems aufwiesen, vor allem in der akuten Phase der Erkrankung (Kuerten et al., 2011), konnte in der MOG₃₅₋₅₅-Studie lediglich in der akuten Phase der EAE eine Pyramidenbahnschädigung nachgewiesen werden (27 % aller Mäuse betroffen), während die Pyramidenbahn in der chronischen EAE vollkommen physiologisch erschien. Weiterhin war die Rückenmarkspathologie in der MOG₃₅₋₅₅-Studie auf inflammatorische Prozesse beschränkt (Recks et al., 2011a), während die histopathologischen Merkmale in der Vergleichsstudie Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigungen einschlossen (Kuerten et al., 2011). Diese Daten zeigen klar auf, dass weitere eingehende Studien der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE vonnöten sind. Die Lichtmikroskopie kann einen guten Überblick über das Ausmaß der Pathologie geben und stellt aufgrund ihrer relativ einfachen Durchführbarkeit besonders für Vergleichsstudien ein wertvolles Analysewerkzeug dar. Insbesondere die Diskrepanzen in der Auswertung der Pyramidenbahnpathologien betonen jedoch eindeutig die Relevanz einer weiterführenden ultrastrukturellen Analyse.

1.6 Ultrastrukturelle Merkmale der Neurodegeneration

Die neurodegenerativen Prozesse Demyelinisierung und Axonschaden gelten als morphologisches Korrelat irreversibler funktioneller Defizite bei MS-Patienten (De Stefano et al., 1998; Trapp et al., 1998; Ferguson et al., 1997). Daher ist es von großer Wichtigkeit, die histopathologischen Muster sowie die Kinetik, in denen Myelin- und Axonschädigungen auftreten, näher zu untersuchen und besser zu verstehen. Insbesondere im Tiermodell sollte vor der Untersuchung spezieller Moleküle oder Mechanismen, die zu einer Neurodegeneration führen können, eine vollständige, grundlegende Charakterisierung der ZNS-Histopathologie vorgenommen werden. So können die Ergebnisse zukünftiger Studien zur therapeutischen Relevanz einzelner Moleküle mit diesen Grundlagenarbeiten verglichen und so die therapeutische Wirksamkeit der untersuchten Moleküle evaluiert werden. Zur objektiven Bewertung von Myelin- und Axonpathologien können dabei verschiedene ultrastrukturelle Merkmale herangezogen werden.

1.6.1 Myelinpathologie

Wird eine Nervenfaser im Rahmen einer Autoimmunreaktion angegriffen, so kommt es zunächst zur Auflösung der Myelinscheide: die einzelnen Myelinlamellen heben sich voneinander ab und das Bild einer „geschwollenen“ Myelinscheide entsteht (Dyer, 2002; Merrill und Scolding, 1999) (Abb. 1-2, A). Im weiteren Verlauf wird die Myelinscheide immer weiter abgebaut bis es schließlich zur vollständigen Entmarkung der Nervenfaser kommt (Abb. 1-2, B).

Um die Dicke der Myelinscheide objektiv zu bestimmen, wird die so genannte *g-Ratio* angewandt (Chomiak und Hu, 2009; Guy et al., 1991). Dazu wird der Durchmesser des Axons ohne Myelinscheide durch den Durchmesser der gesamten Nervenfaser (Myelin und Axon) geteilt. Nach Literaturangaben liegt der optimale Wert für die *g-Ratio* im ZNS bei etwa 0,77 (Chomiak und Hu, 2009).

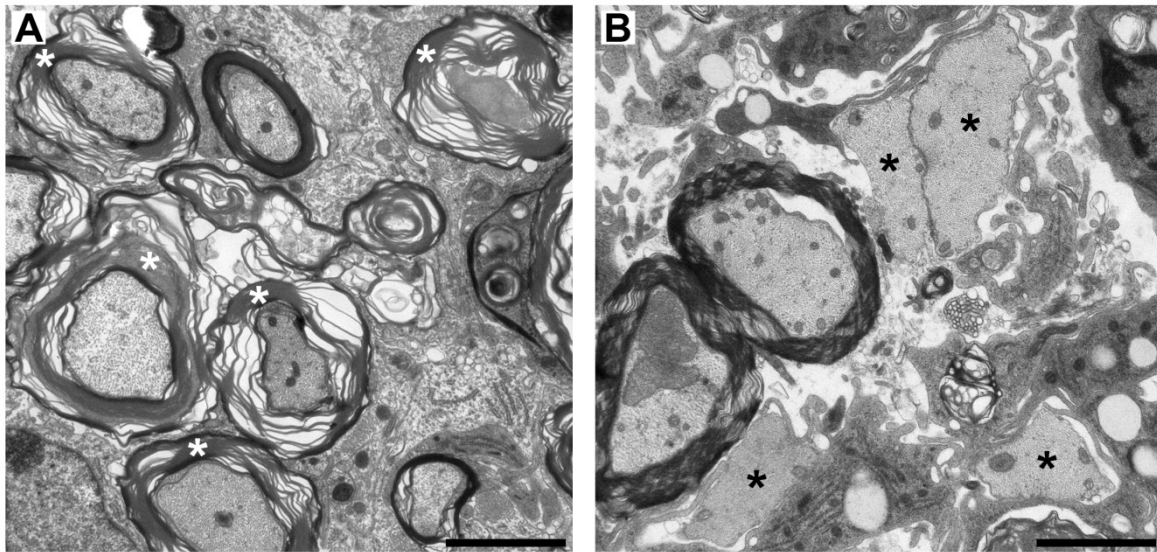


Abb. 1-2. Verschiedene Arten der Myelinpathologie. (A) Im Prozess der Demyelinisierung befindliche Nervenfasern: die Myelinscheide ist in Auflösung begriffen und erscheint „angeschwollen“, die einzelnen Myelinlamellen sind deutlich voneinander abgehoben (weißer Asterisk). (B) Vollständig demyelinisierte Nervenfasern (schwarzer Asterisk). Die Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Ventrolateralstrang MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse (A: chronische EAE, B: akute EAE). Die Maßstabsleiste zeigt 1,5 µm.

1.6.1.1 Remyelinisierung

Bereits in frühen Beschreibungen der MS wurde das Auftreten regenerativer Prozesse im Anschluss an eine Zerstörung der Myelinscheide beschrieben und auch aktuelle Studien konnten das Vorkommen von Remyelinisierung in Läsionen von MS-Patienten nachweisen. Dabei treten regenerative Prozesse durchaus auch schon früh im Krankheitsverlauf auf, so dass das histologische Bild ein Nebeneinander von Myelinzerstörung und -reparatur zeigen kann. In dieser akuten Phase der Erkrankung bleibt die Remyelinisierung jedoch oftmals unvollständig und auf Gebiete am Rande der Läsionen an der Grenze zur *NAWM* beschränkt. In späteren Krankheitsstadien kann es neben dieser unvollständigen Remyelinisierung auch zum Auftreten so genannter *shadow plaques* kommen, bei denen in der gesamten Läsion regenerative Prozesse nachgewiesen werden können (zusammengefasst in Brück et al., 2003). Ultrastrukturell sind remyelinisierte Nervenfasern durch eine sehr dünne, dunkel gefärbte Myelinscheide mit dicht aneinander gelagerten Myelinlamellen charakterisiert (Bondan et al., 2008) (siehe Abb. 1-3).

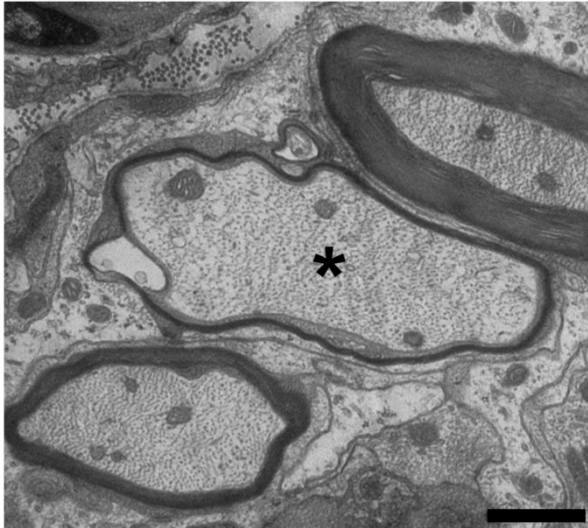


Abb. 1-3. Remyelinisierung. Im Anschluss an einen vollständigen Verlust der Myelinscheide können regenerative Prozesse auftreten und es kommt zum Wiederaufbau der Myelinscheide (Remyelinisierung). Remyelinisierte Nervenfasern sind ultrastrukturell durch eine besonders dünne und dunkel gefärbte Myelinscheide mit dicht gepackten Myelinlamellen charakterisiert (schwarzer Asterisk). Die Maßstabsleiste zeigt 0,7 μm .

1.6.2 Axonschaden

Zu den morphologischen Merkmalen einer Axonschädigung gehört einerseits eine vollständige Degeneration des Axons (Axolyse) (Abb. 1-4, A), die letztlich zu einer Verminderung der axonalen Dichte (*axonal loss*) im ZNS führt. Andererseits wurden in der Literatur eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien (Mao und Reddy, 2010; Schon und Manfredi, 2003), eine Verminderung des Abstandes der einzelnen Neurofilamente im Axon (Lunn et al., 2002) sowie das Auftreten einer vergrößerten *inner tongue* (Cook und Wiśniewski, 1973) als „feine“ Axonschädigungen beschrieben, da bei diesen Formen der Axonpathologie das Axon noch nicht völlig zugrunde gegangen ist.

1.6.2.3 Vergrößerung der axonalen Mitochondrien

Mitochondrien sind für viele wichtige Funktionen einer Zelle unerlässlich, insbesondere für die Produktion des ATP im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung. Eine Beeinträchtigung des Energiehaushaltes durch eine Mitochondrienschädigung führt nicht nur zu einem direkten Mangel an ATP, sondern indirekt auch zur Beeinträchtigung nachgeschalteter Funktionen (z. B. Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase) (Schon und Manfredi, 2003). Besonders Axone benötigen große Mengen ATP, vorwiegend als Kraftstoff für die Natrium-Kalium-ATPase, aber auch für die spannungsabhängigen Natriumkanäle, um die Natriumionen, die während eines Aktionspotenzials ins Axon eintreten, wieder herauszupumpen. Weiterhin kann es im Rahmen eines Mitochondrienschadens durch die Anhäufung von ROS zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen des Axons kommen (Schon und Manfredi, 2003). Ultrastrukturell sind Axone mit einem gestörten mitochondrialen Metabolismus durch einen

vergrößerten Durchmesser der axonalen Mitochondrien (*mitochondrial swelling*) charakterisiert (Mao und Reddy, 2010) (Abb. 1-4, B).

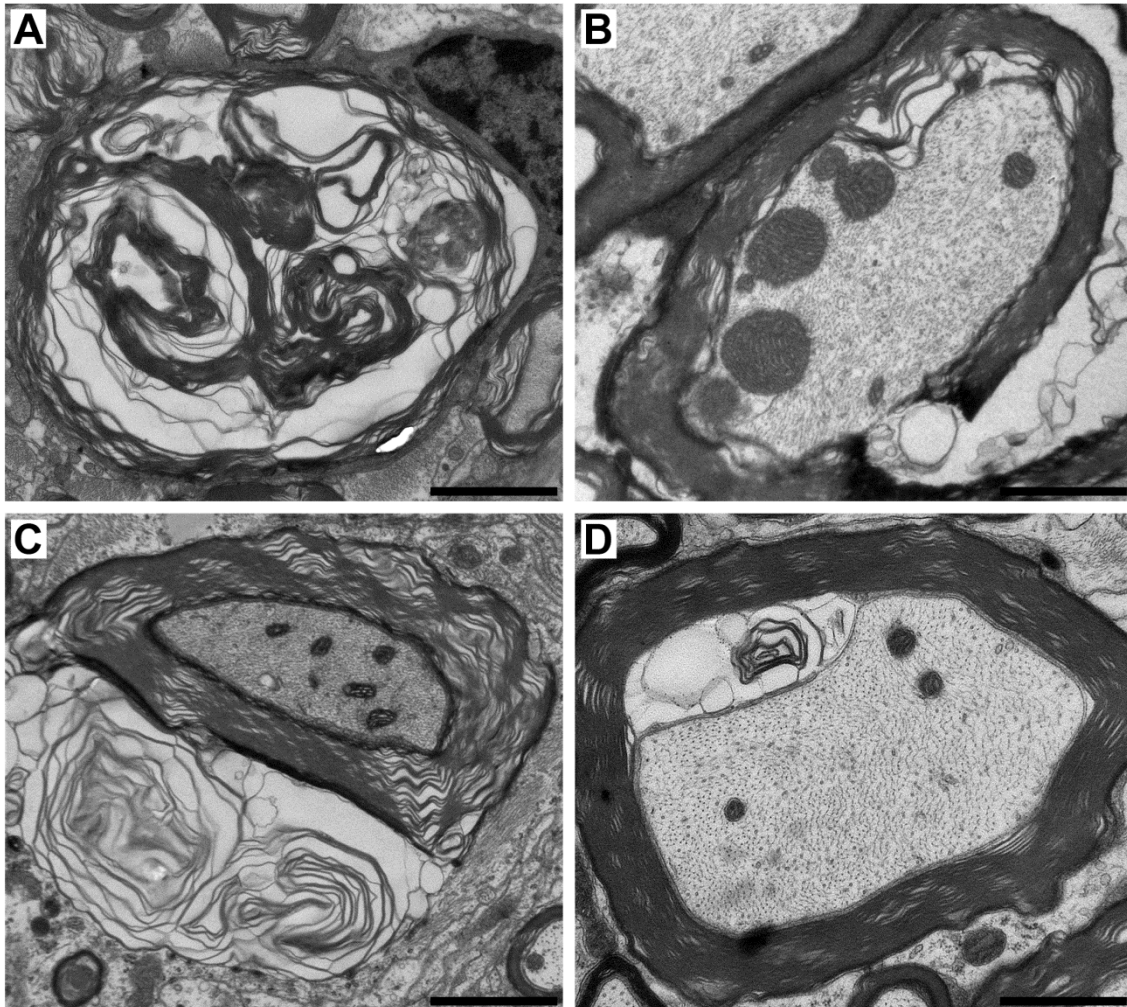


Abb. 1-4. Ultrastrukturelle Merkmale einer Axonpathologie. (A) Vollständige Degeneration des Axons (Axolyse). (B) Vergrößerter Durchmesser der axonalen Mitochondrien. (C) Verringerung im Abstand benachbarter Neurofilamente im Axon (NNND). (D) Vergrößerung der *inner tongue*. Alle Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Ventrolateralstrang MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse. Die Maßstabsleiste zeigt 2,3 µm (A und D) bzw. 1,7 µm (B und C).

1.6.2.4 *Nearest neighbour neurofilament distance*

Die Gruppe um Lunn et al. hat gezeigt, dass der Abstand benachbarter Neurofilamente im Axon (*nearest neighbour neurofilament distance*, NNND) als morphologisches Korrelat für einen normalen Axondurchmesser herangezogen werden kann (Lunn et al., 2002). Der Axondurchmesser bestimmt die Geschwindigkeit der axonalen Reizweiterleitung, daher ist er

für die elektrophysiologischen Eigenschaften einer Nervenfasern von großer Bedeutung. Die Größe des Axondurchmessers wiederum wird von der Anzahl der Neurofilamente bestimmt, wobei die Verteilung innerhalb des Axons vom Phosphorylierungsstatus des Neurofilaments abhängt (deWaegh et al., 1992; Lunn et al., 2002; Petzold et al., 2008; Trapp et al., 1998). Dabei scheint das MAG für die Kontrolle der Neurofilament-Phosphorylierung verantwortlich zu sein (Lunn et al., 2002). Ultrastrukturell zeigen Axone mit pathologischer *NNND* eine Verringerung im Abstand benachbarter Neurofilamente auf (Abb. 1-4, C), wobei Lunn et al. vor allem in demyelinisierten Nervenfasern eine *NNND*-Pathologie nachweisen konnten (Lunn et al., 2002).

1.6.2.5 *Inner tongue*

Die so genannte *inner tongue* bezeichnet den Fortsatz eines Oligodendrozyten, der kleine Axone physiologischerweise ummantelt. Schwillt dieser Fortsatz an, so wird das axonale Zytoplasma in zentrale Richtung verdrängt: es kommt zur Invagination des Axons und zwischen Axon und Myelinscheide entsteht ein zusätzlicher Raum (Abb. 1-4, D). Einige Studien schreiben der *inner tongue* eine wichtige Rolle beim Abbau des Axons zu und erachten eine Vergrößerung der *inner tongue* als Merkmal einer frühen axonalen Störung (Cook und Wiśniewski, 1973). Andere Gruppen vermuten jedoch, dass diese angeschwollenen Fortsätze das Axon nicht direkt komprimieren, da sich die kompakte Myelinscheide ausdehnen und dem Axon so mehr Raum gewähren kann (Edgar et al., 2009; Lappe-Siefke et al., 2003; Morfini et al., 2009).

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Studie ist eine eingehende, elektronenmikroskopische Analyse der ZNS-Histopathologie der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE in der B6-Maus. Dabei sollen besonders die neurodegenerativen Prozesse Demyelinisierung und Axonschaden einer genauen ultrastrukturellen Evaluation unterzogen werden, da diese als morphologisches Korrelat irreversibler funktioneller Defizite im Patienten gelten. Aufgrund der für die MOG₃₅₋₅₅-EAE bereits in früheren Arbeiten evidenten Transition der histopathologischen Merkmale von akuter Inflammation zu chronischer Neurodegeneration (Kuerten et al., 2007; 2008; 2011; Recks et al., 2011a), liegt der Fokus der vorliegenden Studie insbesondere auf den histopathologischen Unterschieden zwischen der akuten, chronischen und langzeit-chronischen Phase der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE. Aufgrund des identischen genetischen Hintergrundes, der einheitlichen Haltungsbedingungen sowie der Immunisierung mit demselben Neuroantigen sind Unterschiede in der ZNS-Histopathologie zwischen einzelnen Mäusen eindeutig den verschiedenen Krankheitsstadien zuzuordnen.

Anhand von Semidünnschnitten soll zunächst zwischen Rückenmarks-Läsionen und lichtmikroskopisch normal erscheinender weißer Substanz (*NAWM*) unterschieden werden, um anschließend alle Parameter getrennt nach Läsionsregion und *NAWM* auswerten zu können.

Ergebnisteil I – Läsionsregion

In der Auswertung der Läsionsregion soll die Evaluation der einzelnen Parameter stets getrennt nach Bahnsystemen (Ventrolateral-, Dorsalstrang, Pyramidenbahn) erfolgen. Folgende morphologische Merkmale einer Neurodegeneration sollen untersucht werden:

- (a) Lässt sich die im Lichtmikroskop evidente Transition der histopathologischen Charakteristika von akuter Inflammation zu chronischer Neurodegeneration im Elektronenmikroskop nachvollziehen?
- (b) Inwieweit unterscheidet sich das Ausmaß der Myelinpathologie in den verschiedenen Krankheitsphasen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE? Die Myelinpathologie soll mittels *g-Ratio* ermittelt werden, wodurch zwischen im Prozess der Demyelinisierung befindlichen Nervenfasern und vollständig demyelinisierten Nervenfasern unterschieden werden kann.

- (c) Finden regenerative Prozesse in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE statt? Zu welchem Krankheitszeitpunkt tritt Remyelinisierung auf?
- (d) Kommt es im Verlauf der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE zum Verlust von Axonen in der weißen Substanz (axonal loss)?
- (e) Ist das Ausmaß der Axonschädigung in Anlehnung an die immunhistochemischen Ergebnisse früherer Studien in allen Krankheitsphasen vergleichbar? Als Merkmale einer Axondegeneration soll zum einen die Axolyse als „grobe“ Axonschädigung gewertet werden, zum anderen sollen eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien, eine Verringerung der *NNND* sowie eine Vergrößerung der *inner tongue* als Charakteristika einer „feinen“ Axonschädigung herangezogen werden.
- (f) Treten Axonpathologien stets in Kombination mit einer Zerstörung der Myelinscheide auf oder lässt sich in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE isolierter Axonschaden nachweisen?

Ergebnisteil II – *NAWM*

In einem zweiten Ansatz sollen dieselben Parameter in der *NAWM* ausgewertet werden um zu ermitteln, ob der Begriff der „normal erscheinenden weißen Substanz“ lediglich lichtmikroskopisch zu gebrauchen ist oder auch auf die Ultrastruktur der weißen Substanz im Rückenmark MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse übertragbar ist.

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

Für die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden 32 weibliche B6-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden im Alter von sechs Wochen von der Firma Charles River in Sulzfeld, Deutschland bezogen und in den tierexperimentellen Einrichtungen des Instituts I für Anatomie der Universität zu Köln gehalten. Die Unterbringung der Mäuse erfolgte in Gruppen von bis zu 5 Tieren in einer konventionellen offenen Käfighaltung. Die Typ II Käfige mit Gitterdeckel waren eingestreut (Lignocel® Hygienic Animal Breeding, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg, Deutschland) und enthielten jeweils ein Haus sowie Nestbaumaterial als Enrichment-Maßnahmen. Der Einstreuwechsel erfolgte wöchentlich. Autoklavierte Futterpellets (Standard-Diät Ratten/Mäuse Zucht, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und frisches, unbehandeltes Wasser in Tränkflaschen mit Trinknippel wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Um die Futter- und Wasserversorgung der Tiere zu gewährleisten, wurde zusätzlich Futter und Wasser auf Bodenhöhe angeboten, sobald die Mäuse paralytische Symptome der EAE zeigten. Die Haltung erfolgte bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C, einer relativen Luftfeuchte von 45-65 % sowie einem Beleuchtungsprogramm mit 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus. Haltung und Behandlung der Mäuse entsprachen den staatlichen Regeln sowie den Anforderungen zur tiergerechten Haltung von Labormäusen der GV-SOLAS (Ausschuss für Labortierhaltung, GV-SOLAS, Universitätsklinikum Charité, Berlin, Deutschland).

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Induktion der EAE

2.2.1.1 Herstellung der Immunisierungslösung

Zur Herstellung der MOG₃₅₋₅₅-Emulsion wurde zunächst inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA) durch Mischen von Paraffinöl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Mannid Monooleat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) im Verhältnis von 9:1 hergestellt. Durch Einmischen von 5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) in IFA wurde CFA angefertigt. Zur Herstellung der Immunisierungslösung wurden für jede Maus 100 µl CFA mit 50 µl sterilem PBS (Dulbecco's PBS without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 50 µl einer 2 mg/ml Stammlösung MOG₃₅₋₅₅ (EZBiolab, Carmel, IN, USA) gemischt. Dazu wurden zwei Spritzen (Luer-LokTM, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) mit einem Dreiwegehahn (Discofix® C-3, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden und durch wiederholtes Mischen wurde eine cremige Emulsion hergestellt.

2.2.1.2 Immunisierung der Mäuse

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase im Alter von 8 Wochen. Auf beiden Körperseiten wurden jeweils 100 µl der MOG₃₅₋₅₅-Emulsion mittels einer 21G Kanüle (MicrolanceTM 3, 21G x 1½" - Nr. 2, 0,8 mm x 40 mm, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) subkutan in die Flanke injiziert, so dass jedes Tier insgesamt 200 µl der Immunisierungslösung und somit eine Gesamtdosis von 50 µl einer 2 mg/ml Stammlösung MOG₃₅₋₅₅ (= 100 µg) erhielt. Gleichzeitig mit der Immunisierung erhielt jede Maus durch intraperitoneale Injektion mittels einer 25G Kanüle (MicrolanceTM 3, 25G x 1" - Nr. 18, 0,5 mm x 25 mm, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 200 ng PTX (List Biological Laboratories, Hornby, ONT, Kanada) in 500 µl sterilem PBS (Dulbecco's PBS without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Eine erneute Verabreichung von PTX erfolgte 48 h nach der Immunisierung an Tag 2. Die Mäuse der Kontrollgruppe erhielten keinerlei Behandlung.

2.2.2 Klinische Beurteilung der EAE

Der klinische Schweregrad der EAE wurde täglich anhand der folgenden Score-Einteilung beurteilt (Tab. 2-1).

Tab. 2-1. Definition der klinischen Scores bei der EAE.

EAE Score	Klinische Symptome
0	o.b.B.
0,5	Parese der Schwanzspitze
1	komplette Schwanzparese
1,5	komplette Schwanzparese und leichte Parese der Hinterläufe (Korrekturreflex beeinträchtigt)
2	komplette Schwanzparese und starke Parese der Hinterläufe (Gang beeinträchtigt)
2,5	vollständige Parese eines Hinterlaufs (ein Bein wird nachgezogen)
3	Paraparese beider Hinterläufe (beide Beine werden nachgezogen)
3,5	Paraparese beider Hinterläufe und leichte Parese der Vorderläufe
4	Paraparese der Vorder- und Hinterläufe (Tetraplegie)
4,5	moribund
5	tot

Zeigte ein Tier Symptome des EAE Scores 4 (Tetraplegie) über mehr als 48 h, so wurde es mittels CO₂ getötet.

2.2.3 Einteilung der Versuchsgruppen

Je nach Krankheitsstadium wurden die Mäuse in verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt: das Einsetzen der ersten klinischen Symptome, die mindestens einen Score von 0,5 erreichten, bis zum Erreichen eines Plateaus wurde als Stadium der akuten EAE definiert; der Zeitpunkt drei Monate nach Krankheitsbeginn wurde als chronische EAE festgelegt, sechs Monate nach Krankheitsbeginn als langzeit-chronische EAE. Tabelle 2-2 zeigt die Einteilung der drei Versuchsgruppen und die Anzahl der Mäuse pro Gruppe (Tab. 2-2).

Tab. 2-2. Einteilung der Mäuse in Versuchsgruppen nach Krankheitsstadium. MW: Mittelwert, STABW: Standardabweichung. ¹Ungepaarter *t*-Test. Ak: akute EAE, chr: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.

Krankheits- stadium	Zeitpunkt der Tötung	Anzahl Mäuse	mittlerer EAE-Score (MW ± STABW)
akut	Einsetzen der ersten klinischen Symptome bis Erreichen eines Plateaus	7	1,71 ± 0,98
chronisch	drei Monate nach Krankheitsbeginn	8	2,25 ± 0,38
langzeit- chronisch	sechs Monate nach Krankheitsbeginn	8	2,06 ± 0,73
Statistische Signifikanz der Unterschiede im mittleren EAE-Score zwischen den Gruppen ¹ : ak vs. chr EAE p = 0,176; ak vs. LT EAE p = 0,446; chr vs. LT EAE p = 0,529			

2.3 Gewebeasservation

2.3.1 Herstellung der Perfusionslösungen

Zur Vorbereitung der transkardialen Perfusion erfolgte zunächst die Herstellung von 0,2 M PBS. Dazu wurden 28,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), 5,2 g Natrium-dihydrogenphosphat-monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und 17,53 g Natriumchlorid (NaCl) (alle Substanzen bezogen von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) abgewogen, mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zur Anfertigung der 0,1 M PBS-Vorspüllösung wurde 0,2 M PBS zu gleichen Teilen mit Aqua bidest. verdünnt. Um die Perfusionslösung herzustellen, wurden 40 g Paraformaldehyd (PFA, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) abgewogen, in 400 ml Aqua bidest. gelöst und unter Rühren auf 60 °C erhitzt. Einige Tropfen 1 N Natronlauge (NaOH , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden hinzugefügt, bis sich die Lösung klärte. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung durch einen Papierfaltenfilter (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) filtriert und mit 500 ml 0,2 M PBS versetzt. Anschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4. Nachdem das Volumen mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt wurde, erfolgte eine erneute Überprüfung des pH-Wertes. 840 ml der PFA-Lösung wurden dann mit 80 ml 25 %

Glutardialdehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gemischt. Zuletzt wurde der pH-Wert noch einmal auf 7,4 eingestellt.

2.3.2 Transkardiale Perfusion mit PFA und Glutaraldehyd

Bei Versuchsende wurden die Mäuse mittels Inhalation von CO₂ tief anästhesiert. Nachdem die Maus in Rückenlage fixiert wurde, erfolgte die Eröffnung von Bauch- und Brusthöhle über einen Medianschnitt. Anschließend wurde das Herz mittels einer Pinzette fixiert und eine Schmetterlingskanüle (Venofix® A 0,8/G21, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Spitze des linken Ventrikels eingeführt, bis in die Aorta ascendens vorgeschoben und fixiert. Es folgte die Eröffnung des rechten Ventrikels, um das Abfließen der Perfusionslösungen zu gewährleisten. Um das Blut aus dem Körper zu entfernen, erfolgte eine Vorspülung mittels 0,1 M PBS. Schließlich wurde das Gewebe mit der Perfusionslösung 30 min fixiert.

2.3.3 Gewebepräparation

Nach der transkardialen Fixation wurde die Maus für 24 h in der Perfusionslösung bei 4 °C nachfixiert. Am nächsten Tag erfolgte die Gewebepräparation, bei der das Rückenmark in ganzer Länge vorsichtig aus dem Vertebralkanal präpariert wurde. Anschließend wurde der lumbale Teil des Rückenmarks mittels Skalpell abgetrennt und in einem Eppendorf Tube (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) erneut für 24 h bei 4 °C in der Perfusionslösung fixiert.

2.4 Histologische Techniken

2.4.1 Epon-Einbettung

Die Bezugsquellen der für die Epon-Einbettung verwendeten Substanzen und Lösungen sind am Ende des Abschnitts tabellarisch gelistet (Tab. 2-3 und 2-4).

Nach der Perfusionsfixation wurde das Gewebe zunächst auf Eis gelagert und drei Mal für je 15 bis 20 min in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,35) gewaschen. Zur weiteren Fixierung und Kontrastverstärkung wurde jedes Segment in 1 ml 1 % Osmiumtetroxid eingelegt und für 4 h auf Eis gestellt. Nach der Osmierung erfolgte zunächst eine dreimalige Spülung mit 0,1 M Cacodylatpuffer für jeweils 30 min auf Eis, bevor das Gewebe schließlich bei -20 °C in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurde. Dazu wurden die Proben 30 min in 50 % Aceton und anschließend kurz in 70 % Aceton eingelegt. Über Nacht wurde mit 1,5 % Uranylacetat in 70 % Aceton blockkontrastiert. Am zweiten Tag der Einbettung wurde das Gewebe in 90 % Aceton überführt und nach 30 min dreimal für 30 min mit 100 % Aceton behandelt. Anschließend wurden die Proben in ein Gemisch aus gleichen Teilen Propylenoxid und 100 % Aceton für 30 min eingelegt. Über eine Behandlung mit reinem Propylenoxid für 30 min wurde das Gewebe in ein Gemisch aus Epon und Propylenoxid zu gleichen Teilen überführt und für 5 h belassen. Über Nacht wurden die Rückenmarksegmente in ein Gemisch aus drei Teilen Epon und einem Teil Propylenoxid bei -20 °C eingelegt. Nachdem sie am dritten Tag der Einbettung zweimal für 12 h bei 4 °C mit reinem Epon behandelt worden waren, wurden sie am vierten Tag in frischem Epon eingebettet. Anschließend polymerisierte das Gewebe bei 60 °C für mindestens drei Tage.

Tab. 2-3. Verwendete Substanzen für die Epon-Einbettung.

Substanz	Bezugsquelle
1,2-Propylenoxid (1,2-Epoxypropan)	Merck
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP)	Fluka
Aceton	J.T.Baker
Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat	AppliChem
Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (DDSA)	Fluka
Epoxy Einbettungsmittel	Fluka
Methyl Nadic Anhydrid (MNA)	Fluka

Osmiumtetroxid (OsO ₄ , 4 %)	Chempur
Reinstwasser	aufgereinigt mittels Reinstwasser-system EASYpure II; Werner
Uranylacetat (1,5 %)	Plano

AppliChem, Darmstadt, Deutschland; Chempur, Karlsruhe, Deutschland; Fluka, St. Louis, MO, USA; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; J.T.Baker, Deventer, Niederlande; Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland; Werner GmbH, Leverkusen, Deutschland.

Tab. 2-4. Verwendete Lösungen für die Epon-Einbettung.

Lösung	Zusammensetzung
Cacodylatpuffer (0,4 M Stammlösung)	42,8 g Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat ad 500 ml Reinstwasser
Cacodylatpuffer (0,1 M)	120 ml Cacodylatpuffer (0,4 M Stammlösung) 360 ml Reinstwasser
Epon	11,56 g Epoxy Einbettungsmittel 7,13 g Dodecenylbernsteinsäureanhydrid (DDSA) 6,28 g Methyl Nadic Anhydrid (MNA) 0,38 g 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP)
Osmiumtetroxid (OsO ₄ , 1 %)	Menge je Rückenmarksegment: 0,25 ml 4 % OsO ₄ 0,1 ml 1 M Cacodylatpuffer 0,65 ml Reinstwasser

2.4.2 Anfertigung der Ultradünnschnitte

Nach der Aushärtung wurden die Gewebelöcke mit den eingebetteten Rückenmarksquerschnitten zunächst mit einem Trimmgerät (TM60; C. Reichert AG, Wien, Österreich) trapezförmig zugeschnitten und angespitzt. Anschließend erfolgte an einem Leica Ultracut UCT Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) die Anfertigung der Ultradünnschnitte mittels Diamantmesser. In der wassergefüllten Wanne des Diamantmessers wurden die 80 nm dicken Ultradünnschnitte zunächst mit Xylol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gestreckt und danach vorsichtig auf Kupfernetze (gilder grid,

150 mesh, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), die mit Formvar (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beschichtet waren, aufgezogen.

2.4.3 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Die Kontrastierung der Proben erfolgte manuell: dazu wurden die Ultradünnschnitte für 20 min auf einzelne Tropfen einer 1 % Uranylacetatlösung (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgelegt und anschließend mit Aqua bidest. gespült. Zur Nachkontrastierung wurden die Proben für 7 min einer Blei-Zitrat-Lösung nach Reynolds ausgesetzt. Für die Herstellung der Bleicitrat-Lösung wurden zunächst 1,99 g 1,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) sowie 1,66 g 1,0 M Blei-Nitrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) jeweils auf 5 ml Aqua bidest. aufgefüllt. Anschließend wurden 144 µl der tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung mit 100 µl der Blei-Nitrat-Lösung, sowie 800 µl Aqua bidest. und 200 µl 1 M NaOH (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gemischt. Nach erneuter Spülung mit Aqua bidest. wurden die Schnitte schließlich luftgetrocknet.

2.4.4 Anfertigung der Semidünnschnitte

Mittels Diamantmesser wurden außerdem 1 µm dicke Semidünnschnitte derselben Gewebeblöcke angefertigt (Leica Ultracut UCT Ultramikrotom, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und auf Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gezogen. Die Schnitte wurden auf einer Heizplatte bei 80 °C getrocknet und 45 Sekunden mit einer Methylenblaulösung aus Methylenblau (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Azur (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Natriumtetraborat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Nach dem Abspülen der Färbelösung mit Aqua bidest. wurden die Proben luftgetrocknet und mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.5 Histologische Quantifizierung

2.5.1 Lichtmikroskopie

Die angefertigten Semidünnschnitte wurden am Lichtmikroskop (Leica DM LB2, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) beurteilt, digitale Bilder wurden mit einer Zeiss AxioCam MRc und dem AxioVision 40 4.7 Softwareprogramm (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. In der 100 x Vergrößerung wurden zunächst Übersichtsaufnahmen der Rückenmarksquerschnitte angefertigt, um die verschiedenen Strangsysteme der weißen Substanz voneinander abzugrenzen. Dabei wurden der Ventrolateralstrang, die Pyramidenbahn sowie der Dorsalstrang beurteilt. Anschließend wurde die 200 x Vergrößerung verwendet, um in dem jeweiligen Strangsystem zwischen Regionen normal erscheinender weißer Substanz (*NAWM*) sowie Läsionen der weißen Substanz zu unterscheiden (Abb. 2-1). Unter der Bezeichnung Läsion wurde dabei jegliche Form von Axon- und/oder Myelinpathologie zusammengefasst (für eine detaillierte Übersicht zu Befunden an Semidünnschnitten MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse siehe Recks et al. 2011a).

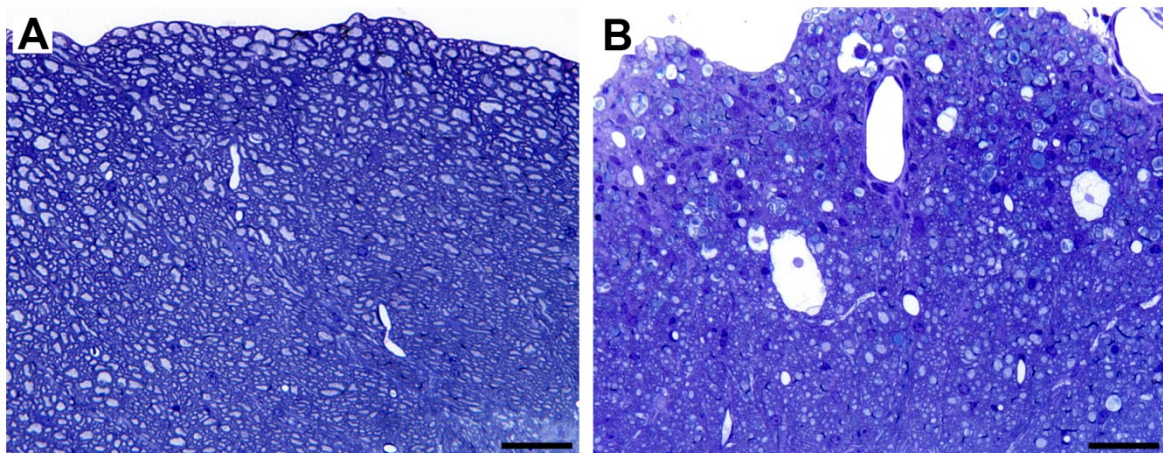


Abb. 2-1. Unterscheidung zwischen *NAWM* und Läsionsregion in methylenblaugefärbten Semidünnschnitten. (A) Lichtmikroskopisch normal erscheinende weiße Substanz (*NAWM*) und (B) typische Rückenmarksläsion im Rückenmark MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse. Die Maßstabsleiste zeigt 40 µm.

2.5.2 Elektronenmikroskopie

Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte an einem Zeiss EM 902 A Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit 80 kV Beschleunigungsspannung. Alle Aufnahmen wurden mit einer digitalen EM Kamera (MegaView III, Olympus Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Deutschland) angefertigt. Die bei der lichtmikroskopischen Beurteilung getroffene Unterscheidung in Ventrolateralstrang, Dorsalstrang und Pyramidenbahn wurde zunächst in der 3000 x Vergrößerung am Elektronenmikroskop nachvollzogen. Anschließend wurden in jedem Strangsystem Bereiche lichtmikroskopisch normal erscheinender weißer Substanz (*NAWM*) und Gebiete mit pathologisch veränderten Nervenfasern (Läsionsregion) ausgewählt. In der 7000 x Vergrößerung wurden nun von jeder Kategorie zehn Bilder pro Strangsystem angefertigt. Nach diesem Schema wurden die Lumbalsegmente der Maus untersucht und abfotografiert, so dass von jeder Maus insgesamt 60 Bilder der weißen Substanz angefertigt wurden. Dieses Schema wurde für alle 32 Mäuse inklusive der Kontrollmäuse angewandt, unabhängig von Krankheitszeitpunkt und Schweregrad der EAE.

2.6 Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder

Die Auswertung der digitalen Bilder wurde mithilfe des Image-Pro Plus Softwareprogramms (Version 6.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) durchgeführt. Für jedes Bild wurde zunächst die Gesamtanzahl der Nervenfasern gezählt, sowie die Gesamtfläche des ausgewerteten Bereichs in mm² ausgemessen. Anschließend wurde jede aufgenommene Nervenfaser auf Myelin- und Axonpathologien untersucht.

2.6.1 Myelinpathologie

Als Myelinpathologie wurde zum einen der vollständige Verlust der Myelinscheide, d. h. eine vollständige Demyelinisierung des Axons, gewertet. Zum anderen wurden Nervenfasern mit einer sichtlichen Dickenzunahme der Myelinscheide und deutlich sichtbarem Abheben der einzelnen Myelinlamellen voneinander als noch im Prozess der Demyelinisierung befindlich berücksichtigt. Zusätzlich wurde als Merkmal der Regeneration nach vorangegangener

Demyelinisierung das Auftreten remyelinisierter Axone untersucht. Diese waren durch dicht gepackte Myelinlamellen und eine besonders dünne und dunkle Myelinscheide charakterisiert.

2.6.1.1 *g-Ratio*

Um die Dicke der Myelinscheide objektiv zu bestimmen, wurde die so genannte *g-Ratio* angewandt (Chomiak und Hu, 2009; Guy et al., 1991). Dazu wurden der Durchmesser der gesamten Nervenfaser (Myelin und Axon) sowie der Durchmesser des Axons ohne Myelinscheide gemessen. Anschließend wurde der Axondurchmesser durch den Gesamtdurchmesser der Nervenfaser geteilt (Abb. 2-2).

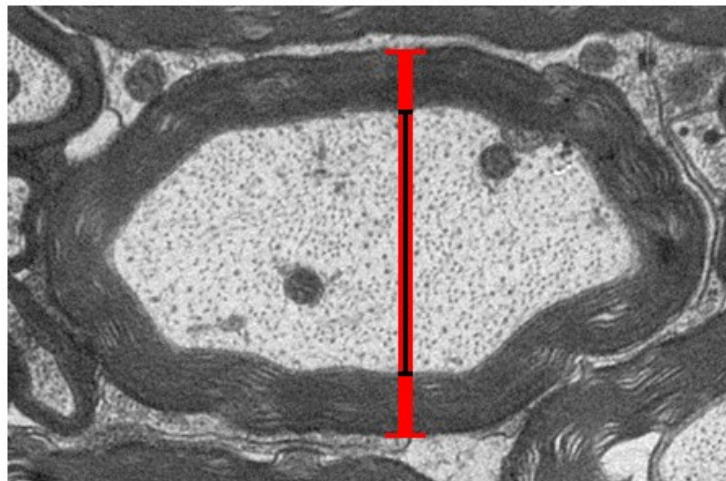


Abb. 2-2. Berechnung der *g-Ratio*. Die Berechnung der *g-Ratio* erfolgte mithilfe der Formel Axondurchmesser (schwarz)/Gesamtdurchmesser der Nervenfaser (rot).

Nach Literaturangaben liegt der optimale Wert für die *g-Ratio* im ZNS bei etwa 0,77 (Chomiak und Hu, 2009). Für die vorliegende Arbeit wurde aus den Aufnahmen der Kontrolltiere jedoch eine genaue *g-Ratio* für jedes der drei untersuchten Strangsysteme ermittelt. Dazu erfolgte für jede fotografierte Nervenfaser der Kontrollmaus die Berechnung der *g-Ratio*. Anschließend wurde aus allen Werten der Mittelwert für das jeweilige Strangsystem gebildet und mit der dreifachen Standardabweichung der Drei-Sigma-Bereich berechnet (Tab. 2-5). Durch dieses Verfahren wurden eventuell auftretende präparations- oder einbettungsbedingte Artefakte berücksichtigt und heraus gerechnet.

Tab. 2-5. Berechnung der *g-Ratio* aus gemessenen Werten der Kontrolltiere. MW: Mittelwert, STABW: Standardabweichung.

	Dorsalstrang	Ventrolateralstrang	Pyramidenbahn
MW Kontrolle 1	0,74	0,72	0,76
MW Kontrolle 2	0,66	0,70	0,76
MW Kontrolle 3	0,66	0,66	0,68
MW Kontrolle 4	0,67	0,67	0,72
MW Kontrolle 5	0,68	0,70	0,74
MW Kontrolle 6	0,60	0,62	0,65
MW Kontrolle 7	0,63	0,59	0,63
MW alle Kontrollen	0,66	0,67	0,71
STABW	0,04	0,05	0,05
Dreifache STABW	0,12	0,15	0,15
Optimale <i>g-Ratio</i>	0,54 – 0,78	0,52 – 0,82	0,56 – 0,86

Die Werte der *g-Ratio* können im Bereich zwischen 0 und 1 liegen, wobei 1 den Wert für eine vollständig demyelinisierte Nervenfaser darstellt, da hier der Gesamtdurchmesser der Nervenfaser dem Durchmesser des Axons entspricht (keine Myelinscheide vorhanden). Werte unterhalb des ausgerechneten Optimalbereiches (Tab. 2-5) weisen auf eine Nervenfaser im Prozess der Demyelinisierung (verdickte Myelinscheide mit voneinander abgehobenen Myelinlamellen) hin. Werte oberhalb des Optimalbereiches bis 0,99 sind kennzeichnend für remyelinisierte Nervenfasern (dünne Myelinscheide mit dicht gepackten Myelinlamellen).

Nach diesem Schema erfolgte die Auswertung der ultrastrukturellen Bilder der EAE-Tiere und die Anzahl an Nervenfasern mit pathologischem Erscheinungsbild der Myelinscheide pro Fläche weißer Substanz wurde berechnet. Zusätzlich wurde eine separate Auswertung für die beiden degenerativen Befunde vollständige Demyelinisierung und im Prozess befindliche Demyelinisierung durchgeführt, sowie für den regenerativen Prozess der Remyelinisierung. Bei allen Auswertungsschritten wurde die Unterteilung nach Bahnsystem beibehalten.

2.6.2 Axonpathologie

Im Rahmen der Auswertung von Axonpathologien wurde zunächst das Auftreten von axonalem Verlust (*axonal loss*) evaluiert: dazu wurde die Gesamtanzahl an physiologischen Axonen/mm² bei Kontroll- und EAE-Tieren ausgezählt. Als physiologisch wurden alle Axone mit intakter Myelinscheide evaluiert.

Anschließend wurden alle Axone auf das Vorhandensein verschiedener morphologischer Charakteristika, die auf eine Axonpathologie hinweisen könnten, untersucht. Einerseits wurde eine vollständige Degeneration des Axons (Axolyse) als „grober“ Axonschaden gezählt. Zum anderen wurden eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien, eine Verminderung des Abstandes der einzelnen Neurofilamente im Axon (*NNND*) sowie das Auftreten einer vergrößerten so genannten *inner tongue* als „feiner“ Axonschaden gewertet, da hier in Abgrenzung zur vollständigen Axolyse die Struktur des Axons noch erhalten war.

2.6.2.1 Mito-Ratio

Analog zur *g-Ratio* wurde zur Objektivierung der Auswertung der Axonpathologien die so genannte *Mito-Ratio* eingeführt. Dazu wurden die Grundfläche des Axon-Querschnittes sowie die Gesamtfläche der Mitochondrien-Querschnitte ausgemessen. Enthielt ein Axon mehrere Mitochondrien, so wurden die Grundflächen aller Mitochondrien zu einem Gesamtwert addiert. Die Berechnung der *Mito-Ratio* erfolgte, indem die Summe der Grundfläche aller Mitochondrien durch die Grundfläche des Axons geteilt wurde (Abb. 2-3).

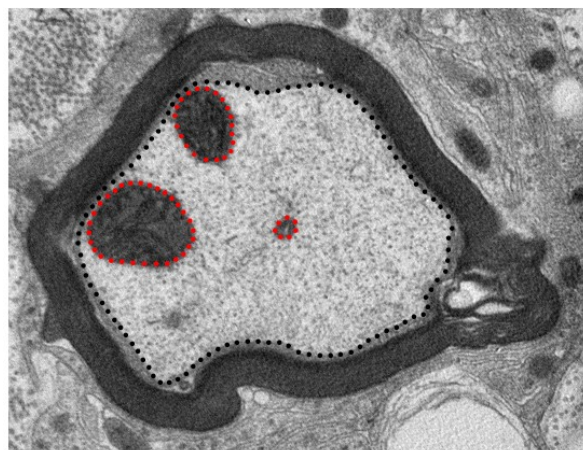


Abb. 2-3. Berechnung der *Mito-Ratio*. Die Berechnung der *Mito-Ratio* erfolgte mithilfe der Formel $\text{Summe der Grundfläche aller Mitochondrien (rot) / Grundfläche des Axons (schwarz)}$.

Entsprechend des Verfahrens zur Berechnung der *g-Ratio* wurde aus den Bildern der Kontrolltiere die *Mito-Ratio* für jedes Axon ermittelt, der Mittelwert gebildet sowie der Drei-Sigma-Bereich errechnet (Tab. 2-6).

Tab. 2-6. Berechnung der *Mito-Ratio* aus gemessenen Werten der Kontrolltiere. MW: Mittelwert, STABW: Standardabweichung.

	Dorsalstrang	Ventrolateralstrang	Pyramidenbahn
MW Kontrolle 1	0,108	0,101	0,144
MW Kontrolle 2	0,268	0,071	0,145
MW Kontrolle 3	0,077	0,123	0,134
MW Kontrolle 4	0,064	0,081	0,149
MW Kontrolle 5	0,064	0,109	0,173
MW Kontrolle 6	0,089	0,100	0,214
MW Kontrolle 7	0,067	0,099	0,170
MW alle Kontrollen	0,105	0,098	0,161
STABW	0,074	0,017	0,027
Dreifache STABW	0,221	0,051	0,082
Optimale <i>Mito-Ratio</i>	bis 0,326	bis 0,149	bis 0,243

Analog zur *g-Ratio* können auch die Werte für die *Mito-Ratio* theoretisch zwischen 0 (Axon ohne Mitochondrium) und 1 (Mitochondrium extrem stark vergrößert, so dass Axon- und Mitochondrienfläche identisch sind) liegen. Die *Mito-Ratio* steigt also proportional zur Größe der Mitochondrien an. Während eine Vergrößerung der Mitochondrien auf einen gestörten mitochondrialen Metabolismus und letztendlich auf eine axonale Pathologie hindeutet (Mao und Reddy, 2010), kann einem besonders kleinen Mitochondrium keine besondere Bedeutung beigemessen werden. Im Unterschied zur *g-Ratio* kann daher für die *Mito-Ratio* kein Optimalbereich angegeben werden, sondern lediglich ein Schwellenwert, oberhalb dessen die *Mito-Ratio* als pathologisch zu werten ist (Tab. 2-6).

2.6.2.2 NNND

Zur objektiven Evaluation des Abstandes benachbarter Neurofilamente im Axon wurde die *NNND* berechnet. Zunächst wurden erneut die Bilder der Kontrolltiere evaluiert, indem pro Nervenfaser jeweils 10 Neurofilament-Abstände gemessen wurden. Unterteilt nach Bahnsystemen wurde für jedes Kontrolltier der Mittelwert gebildet und so der Drei-Sigma-Bereich errechnet (Tab. 2-7).

Tab. 2-7. Berechnung der *NNND* aus gemessenen Werten der Kontrolltiere. MW: Mittelwert, STABW: Standardabweichung.

	Dorsalstrang	Ventrolateralstrang	Pyramidenbahn
MW Kontrolle 1	0,063 µm	0,052 µm	0,036 µm
MW Kontrolle 2	0,064 µm	0,047 µm	0,033 µm
MW Kontrolle 3	0,066 µm	0,051 µm	0,044 µm
MW Kontrolle 4	0,072 µm	0,062 µm	0,042 µm
MW Kontrolle 5	0,090 µm	0,057 µm	0,046 µm
MW Kontrolle 6	0,090 µm	0,059 µm	0,047 µm
MW Kontrolle 7	0,063 µm	0,052 µm	0,047 µm
MW alle Kontrollen	0,073 µm	0,054 µm	0,042 µm
STABW	0,012 µm	0,005 µm	0,006 µm
Dreifache STABW	0,037 µm	0,016 µm	0,017 µm
Optimale <i>NNND</i>	ab 0,036 µm	ab 0,039 µm	ab 0,025 µm

Daraus ergab sich für jedes Bahnsystem ein Schwellenwert für den optimalen Mindestabstand benachbarter Neurofilamente. Die Bilder der EAE-Tiere wurden nun entsprechend des Verfahrens bei den Kontrolltieren ausgewertet und die Anzahl Nervenfasern mit erniedrigter *NNND*/mm² ermittelt.

2.6.3 Art des Schadens

In einem letzten Schritt wurde jedes Bild noch einmal evaluiert, um die Art der Pathologie zu bestimmen. Dazu wurden alle beschriebenen Myelin- und Axonpathologien gezählt und die Häufigkeit eines isoliert vorkommenden Myelin- bzw. Axonschadens sowie einer gleichzeitigen Schädigung beider Anteile der Nervenfaser bestimmt.

2.7 Statistische Analyse

Die Überprüfung der Korrelation erfolgte mit Hilfe der Software SigmaPlot (Version 11.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Konnten Unterschiede zwischen zwei Gruppen ermittelt werden, so wurde der ungepaarte Student's *t*-Test verwendet, um die statistische Signifikanz zu überprüfen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisteil I – Läsionsregion

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine eingehende ultrastrukturelle Charakterisierung der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE. Dabei sollte vor allem das Ausmaß von Myelin- und Axonpathologien in der weißen Substanz ermittelt und mit dem jeweiligen Krankheitsstadium der Maus korreliert werden. Zu diesem Zweck wurden Ultradünnschnitte des lumbalen Rückenmarks von 23 MOG₃₅₋₅₅-immunisierten B6-Mäusen in verschiedenen Phasen der EAE angefertigt und auf neurodegenerative Merkmale hin untersucht. In der Phase der akuten EAE, definiert durch das Einsetzen der ersten klinischen Symptome, wurden insgesamt sieben Mäuse zwecks Rückenmarkspräparation getötet. Drei Monate nach Krankheitsbeginn (chronische EAE) sowie sechs Monate nach Krankheitsbeginn (langzeit-chronische EAE) wurde Gewebe von jeweils acht weiteren Mäusen asserviert. Zur Evaluation der ZNS-Histopathologie wurden drei verschiedene Bahnsysteme (Ventrolateralstrang, Dorsalstrang, Pyramidenbahn) getrennt voneinander beurteilt (vergleiche Abb. 1-1).

Vor der Evaluation der Ultradünnschnitte wurde das ZNS-Gewebe der MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäuse zunächst anhand der ebenfalls angefertigten Semidünnschnitte untersucht, um die weiße Substanz in *NAWM*, also lichtmikroskopisch unauffällige Bereiche der weißen Substanz, und Regionen mit bereits lichtmikroskopisch sichtbaren Pathologien der Nervenfasern (Läsionsregion) einzuteilen. Während im Ventrolateral- und Dorsalstrang eine eindeutige Unterscheidung in Läsionsregion und „*NAWM*“ möglich war, konnten in der Pyramidenbahn lichtmikroskopisch keine sichtbaren Pathologien festgestellt werden, so dass dieses Bahnsystem vollständig zur *NAWM* gerechnet wurde.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst eine erste, grobe Abgrenzung der einzelnen Krankheitsstadien durch bereits in niedriger Vergrößerung (3000 x) sichtbare Pathologien der Nervenfasern vorgenommen werden. Im Anschluss soll dann detailliert auf die Ergebnisse zu Myelin- und Axonpathologien in der Läsionsregion eingegangen werden, bevor abschließend die histopathologischen Merkmale der *NAWM* dargelegt werden.

3.1 Transition von akuter Inflammation zu chronischer Neurodegeneration

Lichtmikroskopisch konnten für die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE der B6-Maus bereits früher Unterschiede in der Läsionsformation zwischen akuten und chronischen Krankheitsstadien nachgewiesen werden: während die akute Phase der EAE vorwiegend durch Inflammation charakterisiert war, konnten in den Läsionen der chronischen und vor allem langzeit-chronischen Phase der EAE ausgedehnte Myelin- und Axonpathologien ohne Anzeichen einer Entzündung gefunden werden (Recks et al., 2011a). Dieses Bild der Transition von akuter Inflammation zu chronischer Neurodegeneration sollte durch die Analyse der Ultradünnschnitte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bevor jedoch jede einzelne Nervenfaser anhand objektiver Kriterien auf ultrastrukturelle Befunde an Myelinscheide und Axon untersucht wurde, sollte eine erste, grobe Abgrenzung der einzelnen Krankheitsstadien durch bereits in einer niedrigen Vergrößerung sichtbare Pathologien vorgenommen werden.

Abhängig vom Krankheitsstadium, in dem sich die Tiere zum Zeitpunkt der Gewebeasservation befanden, konnten auch im Elektronenmikroskop Unterschiede in der ZNS-Histopathologie nachgewiesen werden (Abb. 3-1). Am deutlichsten zeigten sich diese Unterschiede im Hinblick auf die entzündliche Aktivität in den Läsionen. In der akuten Phase der EAE konnten neben einer deutlichen Ödematisierung vermehrt eingewanderte, mononukleäre und polymorphkernige Immunzellen nachgewiesen werden (Abb. 3-1, A). Im chronischen Stadium der Erkrankung drei Monate nach Krankheitsbeginn waren diese Immunzellen nur noch vereinzelt zu finden (Abb. 3-1, B) und sechs Monate nach Krankheitsbeginn (langzeit-chronische EAE) konnten Immunzellinfiltrate schließlich gar nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 3-1, C). Im Gegensatz dazu waren Myelin- und Axonschädigungen auch in der akuten Phase der EAE bereits ersichtlich, wenn auch in geringem Umfang (Abb. 3-1, A). In der chronischen Phase der Erkrankung waren neben im Prozess der Demyelinisierung befindlichen Nervenfasern mit beginnender Auflösung der deutlich angeschwollenen Myelinscheide sowie Nervenfasern mit angeschwollenen Mitochondrien und veränderten Neurofilamenten auch Nervenfasern mit vollständigem Verlust der Myelinscheide und kompletter Degeneration des Axons (Axolyse) vorhanden (Abb. 3-1, B). In der langzeit-chronischen EAE konnten kaum intakte Nervenfasern in der Läsionsregion nachgewiesen werden und der zuvor vorhandene Myelin- und Axondebris war bereits abgeräumt (Abb. 3-1, C).

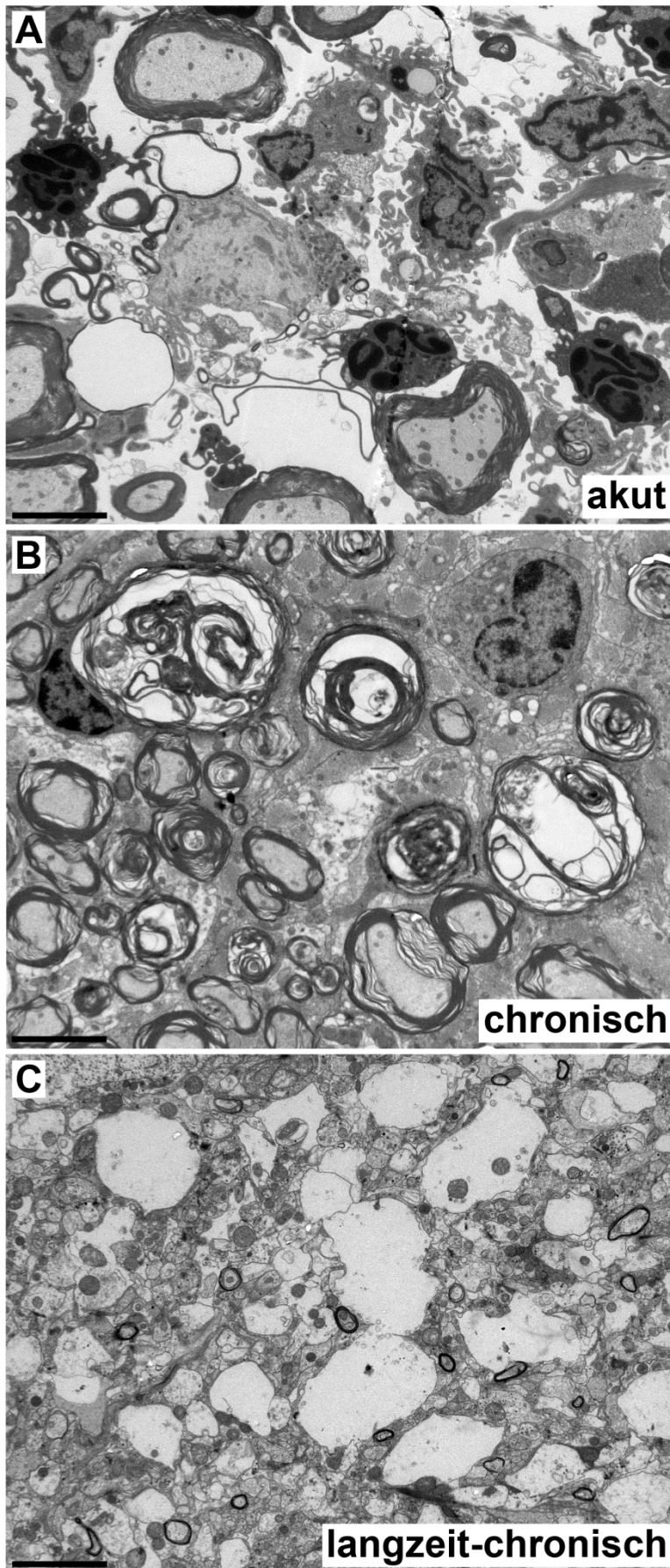


Abb. 3-1. Nach Immunisierung von B6-Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ war die Ausprägung der ZNS-Histopathologie abhängig von der Krankheitsdauer.

(A) Rückenmarksgewebe von Mäusen in der akuten Phase der EAE war charakterisiert durch Infiltration von Immunzellen sowie ausgeprägte Ödematisierung als Zeichen einer bestehenden Entzündungsreaktion. Vereinzelt konnten Anzeichen von Myelin- und Axonschädigungen nachgewiesen werden. (B) In der chronischen Phase der Erkrankung drei Monate nach Krankheitsbeginn fanden sich nur noch wenige Immunzellen, jedoch vermehrt Anzeichen für Myelin- und Axonpathologien. (C) Im ZNS-Gewebe von Mäusen mit einer Krankheitsdauer von sechs Monaten (langzeit-chronische EAE) waren eine massive Neurodegeneration mit fast vollständigem Verlust der Myelinscheide sowie eine Auflösung der axonalen Integrität zu erkennen. Immunzellen waren nicht mehr vorhanden. Abgebildet sind Aufnahmen aus der Läsionsregion des Ventrolateralstrangs, die Maßstabsleiste zeigt 4 µm.

3.2 Myelinpathologie

3.2.1 In der Läsionsregion nahm das Ausmaß der Myelinpathologie zeitlich progredient zu

Im Methodenteil wurde detailliert beschrieben, wie mittels Messung der *g-ratio* jeder einzelnen Nervenfasern objektiv zwischen tatsächlicher Myelinpathologie und präparations- und/oder einbettungsbedingten Artefakten unterschieden wurde (siehe Abschnitt 2.6.1.1). So konnte die Anzahl an Nervenfasern mit Pathologie der Myelinscheide in der Läsionsregion der weißen Substanz (Ventrolateral- und Dorsalstrang wurden hier zusammengefasst) ermittelt werden. Abb. 3-2 zeigt das Ausmaß der Myelinpathologie von nicht-immunisierten Kontrolltieren im Vergleich zu EAE-Tieren aus der akuten, chronischen und langzeit-chronischen Phase der Erkrankung. Während im Rückenmark der Kontrollmäuse vorwiegend Nervenfasern mit intakter Myelinscheide gefunden wurden, konnten im ZNS der EAE-erkrankten Mäuse aus allen drei Krankheitsstadien vermehrt Myelinpathologien nachgewiesen werden (Abb. 3-2). Bereits in der akuten Phase der EAE fanden sich einige Nervenfasern mit deutlichen Anzeichen einer Myelindegeneration bis hin zu vollständigem Verlust der Myelinscheide (Abb. 3-2, B und E), insgesamt wurde ein Wert von 75.196 ± 106.155 Nervenfasern mit Myelinpathologie/mm² in der als Läsionsregion klassifizierten weißen Substanz gemessen. Drei Monate später (chronische EAE) steigerte sich dieser Wert um mehr als das Vierfache und es konnten 317.259 ± 199.504 Nervenfasern mit Myelinpathologie/mm² in der Läsionsregion gezählt werden (Abb. 3-2, C und E). Der Anstieg erreichte statistische Signifikanz (ungepaarter *t*-Test $p < 0,01$). In der langzeit-chronischen Phase der Erkrankung waren in der Läsionsregion kaum noch Nervenfasern mit intakter Myelinscheide vorhanden, und mit 574.614 ± 262.157 Nervenfasern mit Myelinpathologie/mm² war der Wert im Gegensatz zur chronischen EAE deutlich erhöht (ungepaarter *t*-Test akute vs. langzeit-chronische EAE $p < 0,001$, chronische vs. langzeit-chronische EAE $p < 0,01$) (Abb. 3-2, D und E).

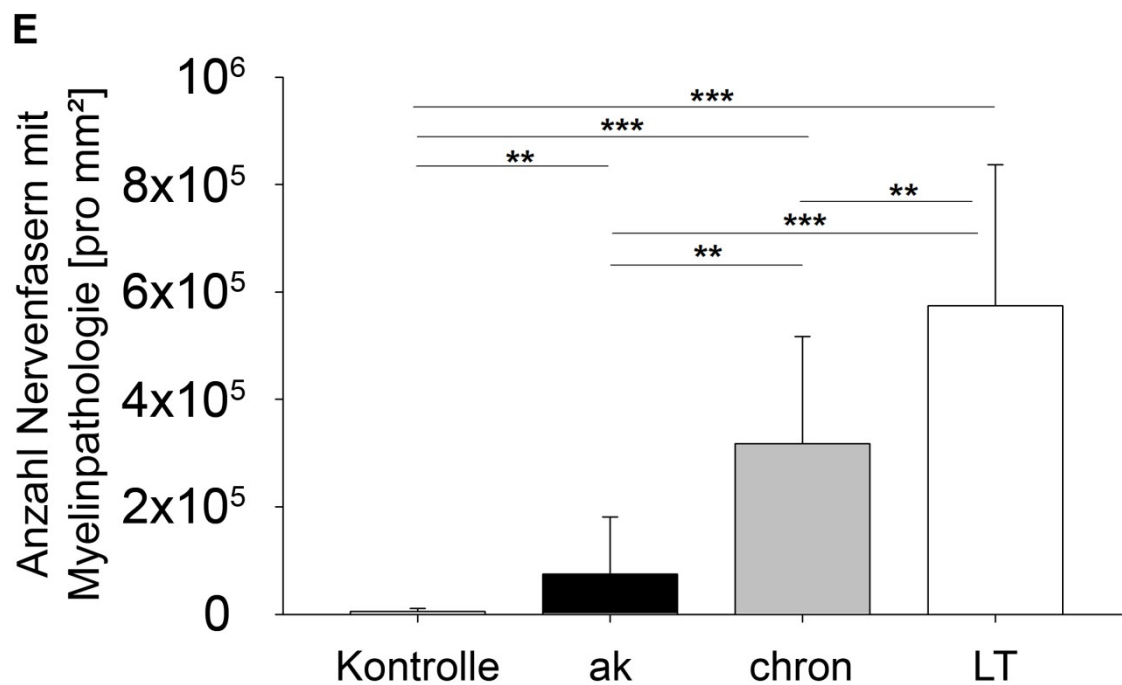
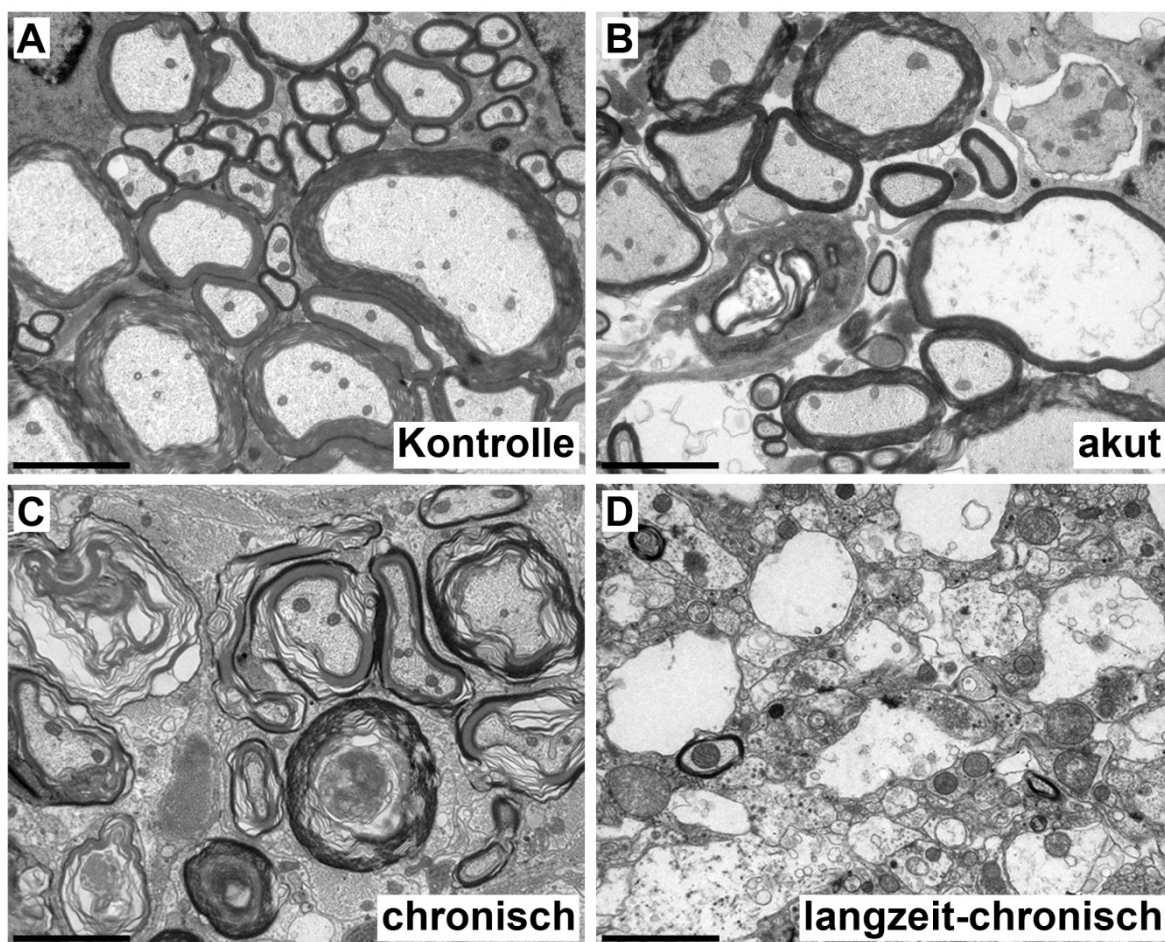


Abb. 3-2. Die Myelinpathologie in der Läsionsregion zeigte einen progressiven Verlauf. (A-D) In der Läsionsregion der weißen Substanz nahm die Myelinpathologie mit der Dauer der Erkrankung zu. **(A)** zeigt Nervenfasern mit intakter Myelinscheide aus dem Rückenmark einer nicht-immunisierten Kontrollmaus. **(B)** Bereits am Höhepunkt der akuten Erkrankung konnten einige Nervenfasern mit pathologischer Myelinscheide nachgewiesen werden. **(C)** Der Anteil an Nervenfasern mit Myelinpathologie steigerte sich drei Monate nach Krankheitsbeginn (chronische EAE). **(D)** In der langzeit-chronischen Phase der EAE sechs Monate nach Krankheitsbeginn konnten in der Läsionsregion nur noch sehr vereinzelt Nervenfasern ohne Myelinpathologie gefunden werden. **(E)** Die Anzahl an Nervenfasern mit Pathologie der Myelinscheide/mm² weiße Substanz in der Läsionsregion stieg im Verlauf der Erkrankung statistisch signifikant an (Kontrolle: 0 ± 0 Nervenfasern mit Myelinpathologie/mm²; ak: 75.196 ± 106.155 Nervenfasern mit Myelinpathologie/mm²; chron: 317.259 ± 199.504 Nervenfasern mit Myelinpathologie/mm²; LT: 574.614 ± 262.157 Nervenfasern mit Myelinpathologie/mm²; ungepaarter *t*-Test ****p* < 0,001; ***p* < 0,01). Die Maßstabsleiste zeigt 2,25 µm. Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.

3.2.2 Die Art der Myelinpathologie war abhängig vom Krankheitsstadium

In der vorliegenden Arbeit wurde neben einer Unterteilung in pathologisches und physiologisches Myelin auch zwischen verschiedenen Arten der Myelinpathologie unterschieden (siehe Abschnitt 1.5.1), um frische Myelinschädigungen von bereits länger andauernden Vorgängen abzugrenzen. Im Prozess der Demyelinisierung befindliche Nervenfasern wurden durch eine unter dem Optimalbereich liegende *g-ratio* eingeordnet, während sich eine vollständige Demyelinisierung per Augenmaß feststellen ließ (die *g-ratio* liegt dementsprechend bei 1).

Eine getrennte Auswertung dieser beiden Arten der Myelinpathologie ergab wiederum Unterschiede zwischen den verschiedenen Krankheitszeitpunkten der EAE. Untersucht wurde die Läsionsregion des Ventrolateral- sowie des Dorsalstrangs im lumbalen Rückenmark. Gemessen an allen gezählten Nervenfasern mit Myelinpathologie wiesen Tiere mit akuter EAE zu jeweils gleichen Teilen eine noch im Prozess befindliche (schwarzer Balken) bzw. eine bereits abgeschlossene Demyelinisierung auf (hellgrauer Balken) (Abb. 3-3). Dies traf für beide Bahnsysteme zu (Ventrolateralstrang 50,00 % Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vs. 50,00 % vollständig demyelinisierte Nervenfasern; Dorsalstrang

54,50 % Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vs. 45,50 % vollständig demyelinisierte Nervenfasern). Im Verlauf der Erkrankung nahm der Prozentsatz an frischen Myelinpathologien ab (chronische EAE: Ventrolateralstrang 30,06 % Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vs. 69,94 % vollständig demyelinisierte Nervenfasern; Dorsalstrang 39,30 % Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vs. 60,70 % vollständig demyelinisierte Nervenfasern), bis sechs Monate nach Krankheitsbeginn nur noch sehr vereinzelt Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vorhanden waren (langzeit-chronische EAE: Ventrolateralstrang 0,07 % Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vs. 99,93 % vollständig demyelinisierte Nervenfasern; Dorsalstrang 8,21 % Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vs. 91,79 % vollständig demyelinisierte Nervenfasern).

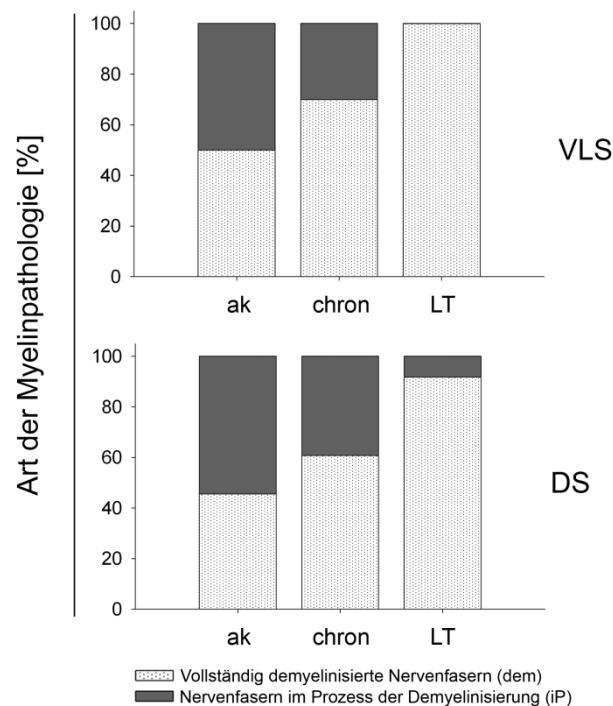


Abb. 3-3. Art der Myelinpathologie in der Läsionsregion verschiedener Bahnsysteme. Als Myelinpathologie wurden zum einen vollständig demyelinisierte Nervenfasern gewertet (hellgrau), zum anderen Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung (schwarz). Zu Beginn der Erkrankung waren beide Ausprägungen zu gleichen Teilen vorzufinden (VLS ak: 50,00 % iP vs. 50,00 % dem; DS ak: 54,50 % iP vs. 45,50 % dem). Im weiteren Verlauf nahm der Anteil vollständig demyelinisierter Nervenfasern stetig zu (VLS chr: 30,06 % iP vs. 69,94 % dem; DS chr: 39,30 % iP vs. 60,70 % dem), sodass in der langzeit-chronischen Phase der Erkrankung kaum noch frische Myelinschäden zu finden waren, sondern die Myelinscheiden der betroffenen Nervenfasern alle vollständig zerstört waren (VLS LT: 0,07 % iP vs. 99,93 % dem; DS LT: 8,21 % iP vs. 91,79 % dem). Angegeben ist der prozentuale

Anteil der beiden untersuchten Arten der Myelinpathologie an der insgesamt gemessenen Myelinpathologie in der Läsionsregion des Ventrolateral- bzw. Dorsalstrangs. Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, dem: vollständig demyelinisierte Nervenfasern, DS: Dorsalstrang, iP: Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung, LT: langzeit-chronische EAE, VLS: Ventrolateralstrang.

3.2.3 Eine Regeneration der Myelinscheide fand erst in der späten Phase der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE statt

In der vorliegenden Arbeit konnten im ZNS-Gewebe der MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäuse lediglich bei Tieren in der langzeit-chronischen Phase der Erkrankung vermehrt Anzeichen einer Myelinregeneration nachgewiesen werden. Ultrastrukturell sind remyelinisierte Nervenfasern durch eine sehr dünne, dunkel gefärbte Myelinscheide mit dicht aneinander gelagerten Myelinlamellen charakterisiert (Abb. 3-4, A). Die Abnahme in der Dicke der Myelinscheide spiegelt sich in *g-ratio*-Werten oberhalb des Normalbereiches wider (siehe Abschnitt 2.6.1.1). In der Läsionsregion des Ventrolateralstrangs lag die Anzahl remyelinisierter Nervenfasern/mm² im akuten (266 ± 595) und chronischen (159 ± 449) Stadium der EAE fast auf Kontrollniveau (0 ± 0) und war erst sechs Monate nach Krankheitsbeginn mit einem Wert von 14.556 ± 12.107 remyelinisierte Nervenfasern/mm² signifikant erhöht (ungepaarter *t*-Test Kontrolle vs. langzeit-chronische EAE $p < 0,01$, akute vs. langzeit-chronische EAE $p < 0,05$, chronische vs. langzeit-chronische EAE $p < 0,01$) (Abb. 3-4, B). Auch in den Läsionen des Dorsalstrangs konnten lediglich in der langzeit-chronischen Phase der EAE regenerative Prozesse nachgewiesen werden (6.418 ± 12.988 remyelinisierte Nervenfasern/mm²; Kontrolle, akute EAE, chronische EAE: 0 ± 0 remyelinisierte Nervenfasern/mm²), aufgrund der hohen Standardabweichung erreichte der Unterschied hier jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 3-4, C). In den untersuchten Läsionen des Ventrolateralstrangs wurden insgesamt mehr als doppelt so viele remyelinisierte Nervenfasern/mm² nachgewiesen als im Dorsalstrang (nicht signifikant).

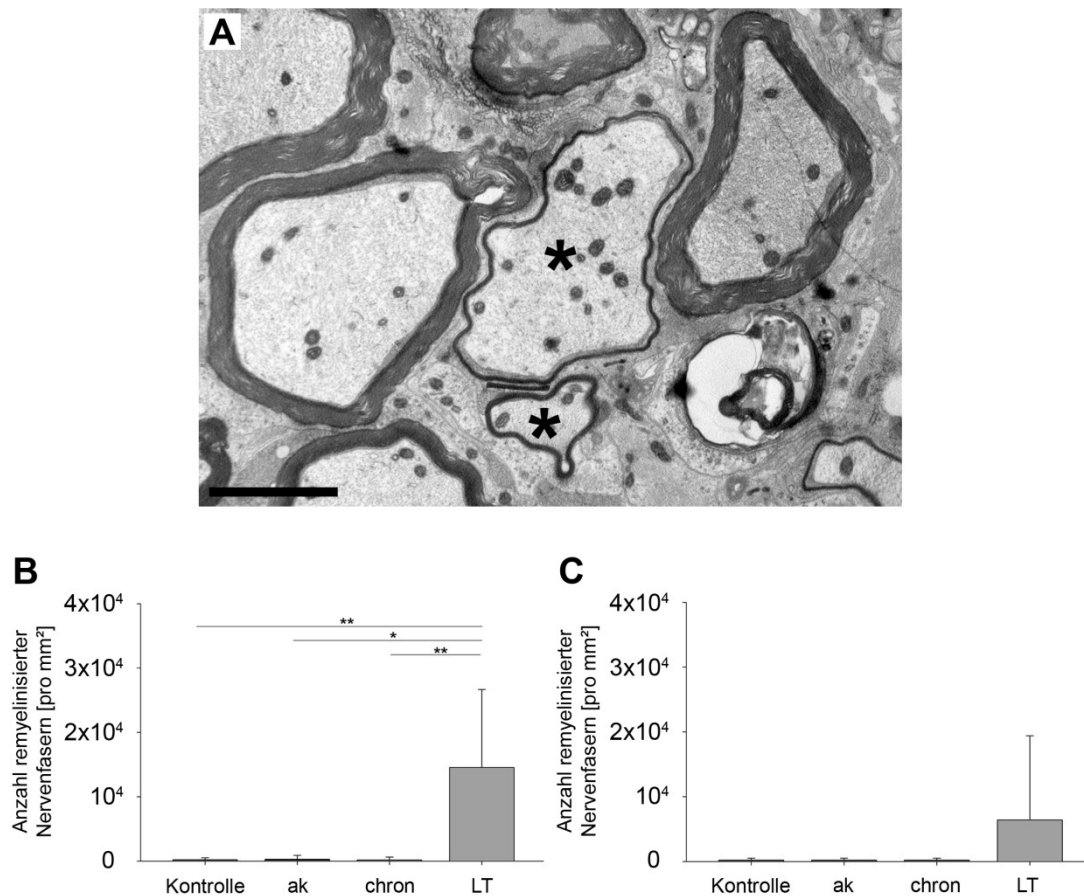


Abb. 3-4. Das Auftreten von Remyelinisierung war mit einem zeitlich weit vorangeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert. (A) Als Charakteristikum der langzeit-chronischen Phase der Erkrankung sechs Monate nach Krankheitsbeginn waren vermehrt remyelinisierte Nervenfasern (Asterisk) in der Läsionsregion vorzufinden, bei denen die Lamellen der neugebildeten Myelinscheide eng aneinandergelagert und besonders dunkel gefärbt waren. **(B)** Während im Ventrolateralstrang von nicht-immunisierten Kontrolltieren sowie von Mäusen in der akuten und chronischen Phase der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE kaum regenerative Prozesse nachgewiesen werden konnten, war die Anzahl remyelinisierter Nervenfasern in der langzeit-chronischen EAE signifikant erhöht (Kontrolle: 0 ± 0 remyelinisierte Nervenfasern/mm²; ak: 266 ± 595 remyelinisierte Nervenfasern/mm²; chr: 159 ± 449 remyelinisierte Nervenfasern/mm²; LT: 14.556 ± 12.107 remyelinisierte Nervenfasern/mm²). **(C)** Auch im Dorsalstrang fanden sich lediglich bei Mäusen mit einer Krankheitsdauer von sechs Monaten remyelinisierte Nervenfasern (Kontrolle, ak, chr: 0 ± 0 remyelinisierte Nervenfasern/mm²; LT: 6.418 ± 12.988 remyelinisierte Nervenfasern/mm²), der Unterschied erreichte aufgrund der Standardabweichung jedoch keine statistische Signifikanz. Somit wurden im Ventrolateralstrang mehr als doppelt so viele remyelinisierte Nervenfasern/mm² nachgewiesen als im Dorsalstrang. Ungepaarter *t*-Test $**p < 0,01$; $*p < 0,05$. Die Maßstabsleiste zeigt 2,25 μ m. Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.

3.3 Axonschaden

Seit der „Wiederentdeckung“ der Axonschädigung als histopathologisches Charakteristikum der MS durch die Gruppe um Trapp et al. (Trapp et al., 1998) stand die Erforschung axonaler Pathologien im Fokus großer Forschungsanstrengungen und stellt heute ein weithin akzeptiertes, wichtiges Merkmal der MS-Pathologie dar. In der vorliegenden Arbeit wurden daher neben der ultrastrukturellen Betrachtung der Myelinscheide auch pathologische Veränderungen am Axon untersucht.

3.3.1 Die axonale Dichte war bei MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen signifikant verringert im Gegensatz zu Kontrolltieren

Zunächst wurde das Auftreten von axonalem Verlust (*axonal loss*) in der Läsionsregion der weißen Substanz evaluiert. Im Vergleich zu Kontrolltieren konnte für die MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäuse in beiden untersuchten Bahnsystemen ein signifikanter axonaler Verlust festgestellt werden. Im Ventrolateralstrang wurde in der Kontrollgruppe ein Wert von 399.344 ± 97.868 Axone/mm² gemessen. Die MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen zeigten bereits zu Beginn der Erkrankung eine höchst signifikante Abnahme in der Anzahl der Axone (133.382 ± 78.800 Axone/mm²; ungepaarter *t*-Test Kontrolle vs. akute EAE $p < 0,001$). Die axonale Dichte blieb über das chronische (125.382 ± 74.725 Axone/mm²) sowie langzeit-chronische Stadium (100.480 ± 48.010 Axone/mm²) der EAE hinweg signifikant erniedrigt (ungepaarter *t*-Test Kontrolle vs. chronische bzw. langzeit-chronische EAE $p < 0,001$). Dies entsprach einem axonalen Verlust von 66,60 % (akut), 68,60 % (chronisch) sowie 74,84 % (langzeit-chronisch) im Gegensatz zur Kontrollgruppe (0 %). Zwischen den einzelnen Krankheitszeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (ungepaarter *t*-Test akute vs. chronische EAE $p = 0,843$, akute vs. langzeit-chronische EAE $p = 0,339$, chronische vs. langzeit-chronische EAE $p = 0,441$) (Abb. 3-5, A). Im Dorsalstrang betrug das Ausmaß des axonalen Verlustes in der akuten EAE lediglich 31,24 % (Kontrolle: 349.605 ± 65.170 Axone/mm²; akute EAE: 240.395 ± 111.565 Axone/mm²; ungepaarter *t*-Test $p = 0,057$), stieg aber im Verlauf der Erkrankung auf über 50 % an (chronische EAE: 135.634 ± 59.437 Axone/mm²; langzeit-chronische EAE: 171.741 ± 73.523 Axone/mm²; ungepaarter *t*-Test Kontrolle vs. chronische bzw. langzeit-chronische EAE $p < 0,001$). Auch in diesem Strangsystem wurde keine statistische Signifikanz zwischen den chronischen Phasen der Erkrankung (ungepaarter *t*-Test chronische vs. langzeit-chronische EAE

$p = 0,296$) sowie der akuten und langzeit-chronischen Phase der Erkrankung (ungepaarter t -Test $p = 0,204$) erreicht, während zwischen akuter und chronischer EAE ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Axone ermittelt werden konnte (ungepaarter t -Test $p < 0,05$) (Abb. 3-5, B).

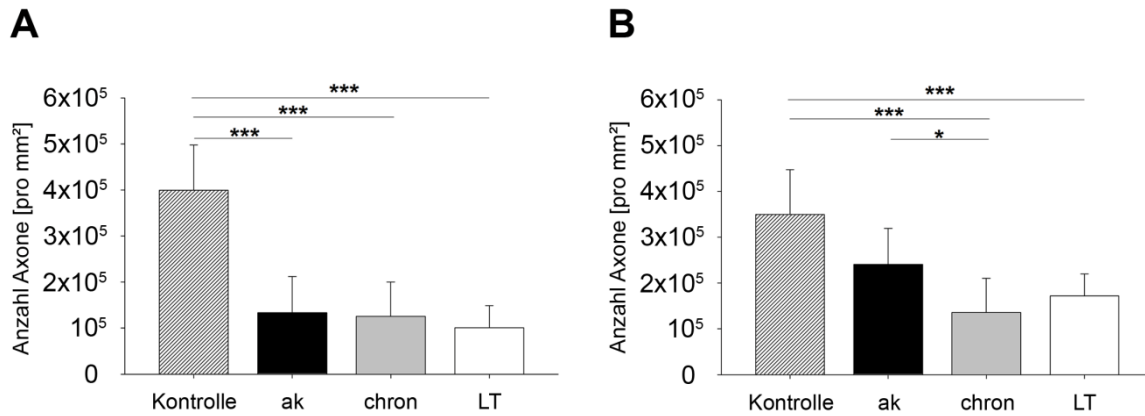
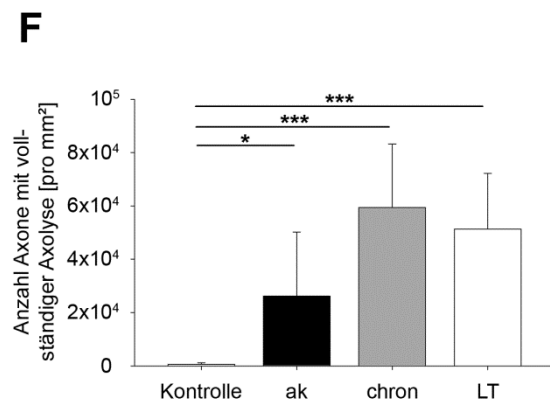
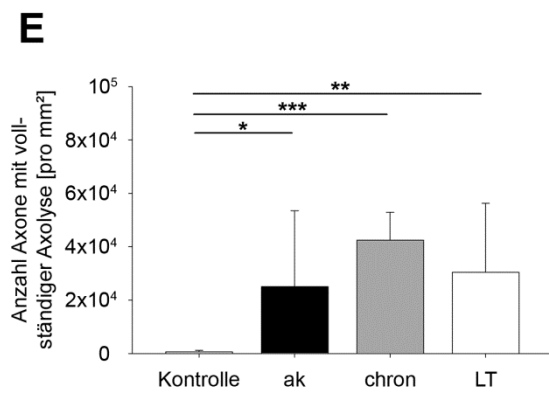
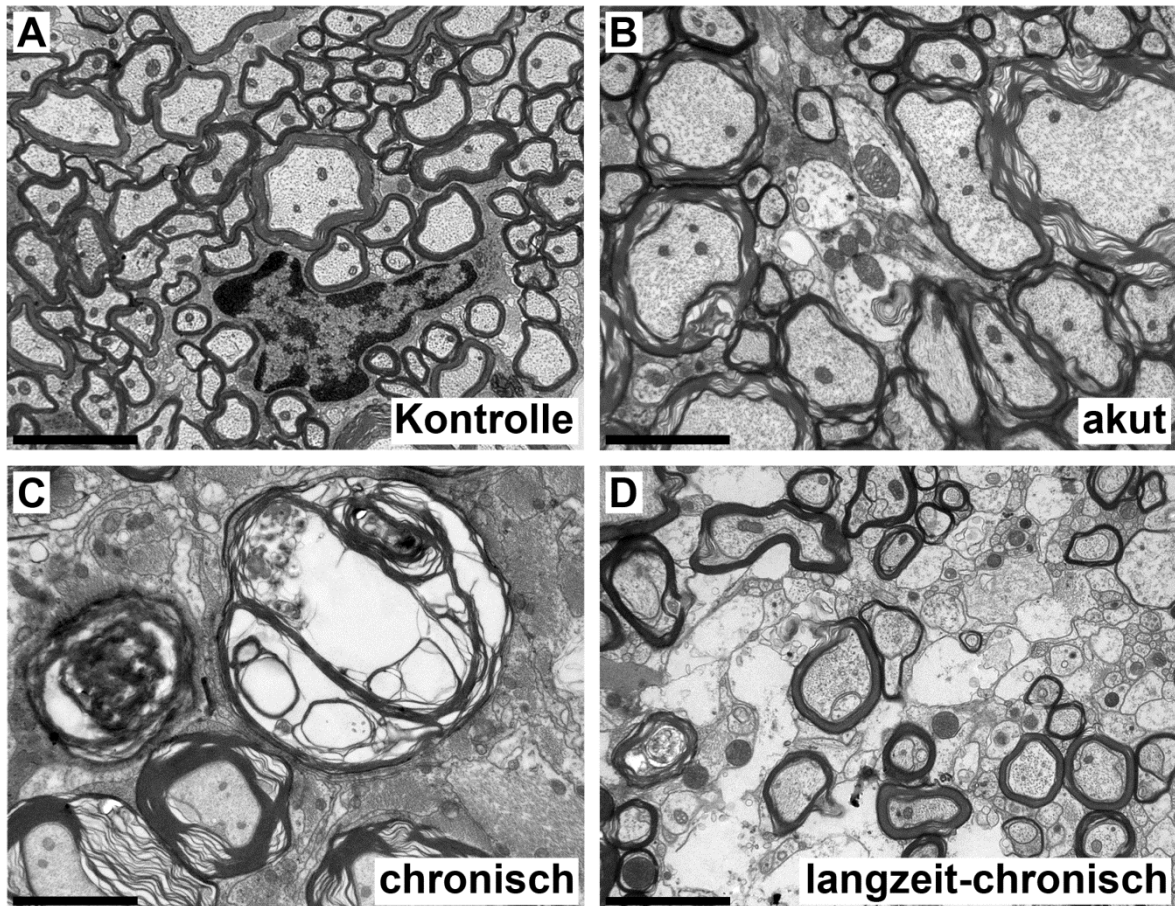


Abb. 3-5. Die Gesamtanzahl an Axonen/mm² in der Läsionsregion der weißen Substanz war bei MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen im Gegensatz zu nicht-immunisierten Kontrollmäusen signifikant niedriger. (A) Ventrolateralstrang (Kontrolle: 399.344 ± 97.868 Axone/mm²; ak: 133.382 ± 78.800 Axone/mm²; chr: 125.382 ± 74.725 Axone/mm²; LT: 100.480 ± 48.010 Axone/mm²). (B) Dorsalstrang (Kontrolle: 349.605 ± 65.170 Axone/mm²; ak: 240.395 ± 111.565 Axone/mm²; chr: 135.634 ± 59.437 Axone/mm²; LT: 171.741 ± 73.523 Axone/mm²). Ungepaarter t -Test * $p < 0,001$; * $p < 0,05$. Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.**

3.3.2 Die Anzahl an lytischen Axonen war in allen Krankheitsphasen vergleichbar

Das Auftreten von Axolyse wurde als „grober“ Axonschaden gewertet, da es bei den betroffenen Nervenfasern zu einer vollständigen Degeneration des Axons kam. Im Gegensatz dazu standen auf den ersten Blick unversehrt erscheinende Axone, die lediglich Veränderungen an den Organellen aufwiesen, welche als „feine“ Axonschädigungen gewertet wurden. Die Anzahl an Nervenfasern mit Axolyse war in allen Phasen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE im Gegensatz zu nicht-immunisierten Kontrolltieren (0 ± 0 lytische Axone/mm²) (Abb. 3-6, A) signifikant erhöht (ungepaarter *t*-Test Kontrolle vs. akute EAE: VLS: $p = 0,038$, DS: $p = 0,014$; Kontrolle vs. chronische EAE: VLS: $p < 0,001$, DS: $p < 0,001$; Kontrolle vs. langzeit-chronische EAE: VLS: $p = 0,005$, DS: $p < 0,001$). Dabei traten lytische Axone bereits in der frühen Phase der Erkrankung auf (akute EAE: VLS: 25.084 ± 28.433 lytische Axone/mm², DS: 26.220 ± 23.943 lytische Axone/mm²) (Abb. 3-6, B, E und F). Im Verlaufe der Erkrankung kam es zu einer leichten Zunahme an lytischen Axonen (chronische EAE: VLS: 42.490 ± 10.405 lytische Axone/mm², DS 59.445 ± 23.833 lytische Axone/mm²; langzeit-chronische EAE: VLS: 30.437 ± 25.909 lytische Axone/mm², DS: 51.325 ± 20.899 lytische Axone/mm²) (Abb. 3-6, C-F), der Anstieg erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (ungepaarter *t*-Test akute vs. chronische EAE: VLS: $p = 0,129$, DS: $p = 0,054$; akute vs. langzeit-chronische EAE: VLS: $p = 0,719$, DS: $p = 0,101$; chronische vs. langzeit-chronische EAE: VLS: $p = 0,246$, DS: $p = 0,511$).

Abb. 3-6. Das Auftreten lytischer Axone wurde als „grober“ Axonschaden gewertet und konnte in allen untersuchten Krankheitsphasen ermittelt werden. Während im Rückenmark nicht-immunisierter Kontrollmäuse keine Axolyse vorzufinden war (**A**), konnten bei MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen an allen drei untersuchten Krankheitszeitpunkten zahlreiche axolytische Nervenfasern nachgewiesen werden (**B-D**). Dabei waren die Unterschiede in der Anzahl an Axonen mit vollständiger Axolyse/mm² sowohl im Ventrolateralstrang (**E**) (Kontrolle: 0 ± 0 axolytische Axone/mm²; ak: 25.084 ± 28.433 axolytische Axone/mm²; chr: 42.490 ± 10.405 axolytische Axone/mm²; LT: 30.437 ± 25.909 axolytische Axone/mm²), als auch im Dorsalstrang (**F**) (Kontrolle: 0 ± 0 axolytische Axone/mm²; ak: 26.220 ± 23.943 axolytische Axone/mm²; chr: 59.445 ± 23.833 axolytische Axone/mm²; LT: 51.325 ± 20.899 axolytische Axone/mm²) zwischen den drei Zeitpunkten nicht statistisch signifikant (Ungepaarter *t*-Test VLS: ak vs. chr $p = 0,129$, ak vs. LT $p = 0,719$, chr vs. LT $p = 0,246$; DS: ak vs. chr $p = 0,054$, ak vs. LT $p = 0,101$, chr vs. LT $p = 0,511$). Ungepaarter *t*-Test *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Die Maßstabsleiste zeigt 2,7 μ m. Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, DS: Dorsalstrang, LT: langzeit-chronische EAE, VLS: Ventrolateralstrang.



3.3.3 Nicht alle der als „feine“ Axonpathologien beschriebenen Merkmale konnten bei EAE-Tieren vermehrt nachgewiesen werden

Bei der Untersuchung der als „feine“ Axonschädigungen klassifizierten Parameter Mitochondriengröße, Neurofilamentabstand und *inner tongue*-Vergrößerung konnten die beiden erstgenannten Pathologien bei den EAE-Tieren vermehrt nachgewiesen werden, während eine Vergrößerung der *inner tongue* im Gegensatz zu den Kontrollmäusen nicht vermehrt auftrat. Daher werden im Folgenden zunächst die Ergebnisse zu den eindeutig als „feine“ Axonschädigung zu wertenden Merkmalen Mitochondriengröße und Neurofilamentabstand gezeigt (siehe Abschnitt 3.3.3.1), während die Kinetik der *inner tongue* im Anschluss separat dargestellt wird (Abschnitt 3.3.3.2).

3.3.3.1 Die Kinetik „feiner“ Axonschädigung zeigte strangabhängige Unterschiede

Während das Ausmaß „groben“ Axonschadens in beiden untersuchten Strangsystemen über die Zeit hinweg relativ konstant blieb, konnten für die Kinetik der „feinen“ Axonschädigungen deutliche Unterschiede zwischen Ventrolateral- und Dorsalstrang festgestellt werden. Als „feiner“ Axonschaden wurde zum einen eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien, ermittelt durch Messung der *Mito-Ratio* (siehe Abschnitt 2.6.2.1), gewertet; zum anderen wurde eine Verringerung im Abstand benachbarter Neurofilamente im Axon, *NNND* (siehe Abschnitt 2.6.2.2), zur Evaluation feiner Axonschädigungen herangezogen.

Im Gegensatz zum Ventrolateralstrang, in dem das Ausmaß der Pathologie bei beiden untersuchten Merkmalen über die Zeit hinweg relativ konstant blieb (analog zur Axolyse), konnte im Dorsalstrang ein progressiver Anstieg an Nervenfasern mit „feiner“ Axonpathologie verzeichnet werden. Dabei erreichten die Werte in letzterem Bahnsystem erst in den späteren Phasen der Erkrankung das Niveau der Pathologien im Ventrolateralstrang (Abb. 3-7 und 3-8; Tab. 3-1).

Tab. 3-1. Anzahl Axone mit „feiner“ Mitochondrienpathologie. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. ¹Ungepaarter *t*-Test. ak: akute EAE, chr: chronische EAE, Ktrl: Kontrolle, LT: langzeit-chronische EAE.

Bahnsystem / Krankheitsstadium	Axone mit vergrößerten Mitochondrien/mm²	Axone mit erniedrigtem NNND/mm²
<u>Ventrolateralstrang:</u>		
Kontrolle	0 \pm 0	0 \pm 0
akut	29.025 \pm 22.179	97.179 \pm 103.105
chronisch	27.837 \pm 19.674	116.991 \pm 83.829
langzeit-chronisch	30.357 \pm 20.086	176.681 \pm 43.206
	Ktrl vs. ak p = 0,005 ¹	Ktrl vs. ak p = 0,028 ¹
	Ktrl vs. chr p = 0,003 ¹	Ktrl vs. chr p = 0,003 ¹
	Ktrl vs. LT p = 0,002 ¹	Ktrl vs. LT p < 0,001 ¹
	ak vs. chr p = 0,914 ¹	ak vs. chr p = 0,688 ¹
	ak vs. LT p = 0,905 ¹	ak vs. LT p = 0,107 ¹
	chr vs. LT p = 0,804 ¹	chr vs. LT p = 0,139 ¹
<u>Dorsalstrang:</u>		
Kontrolle	0 \pm 0	0 \pm 0
akut	7.011 \pm 17.172	33.156 \pm 17.590
chronisch	11.171 \pm 13.988	106.851 \pm 80.532
langzeit-chronisch	22.917 \pm 24.694	180.473 \pm 137.832
	Ktrl vs. ak p = 0,300 ¹	Ktrl vs. ak p < 0,001 ¹
	Ktrl vs. chr p = 0,056 ¹	Ktrl vs. chr p = 0,004 ¹
	Ktrl vs. LT p = 0,030 ¹	Ktrl vs. LT p = 0,005 ¹
	ak vs. chr p = 0,626 ¹	ak vs. chr p = 0,073 ¹
	ak vs. LT p = 0,203 ¹	ak vs. LT p = 0,041 ¹
	chr vs. LT p = 0,261 ¹	chr vs. LT p = 0,221 ¹

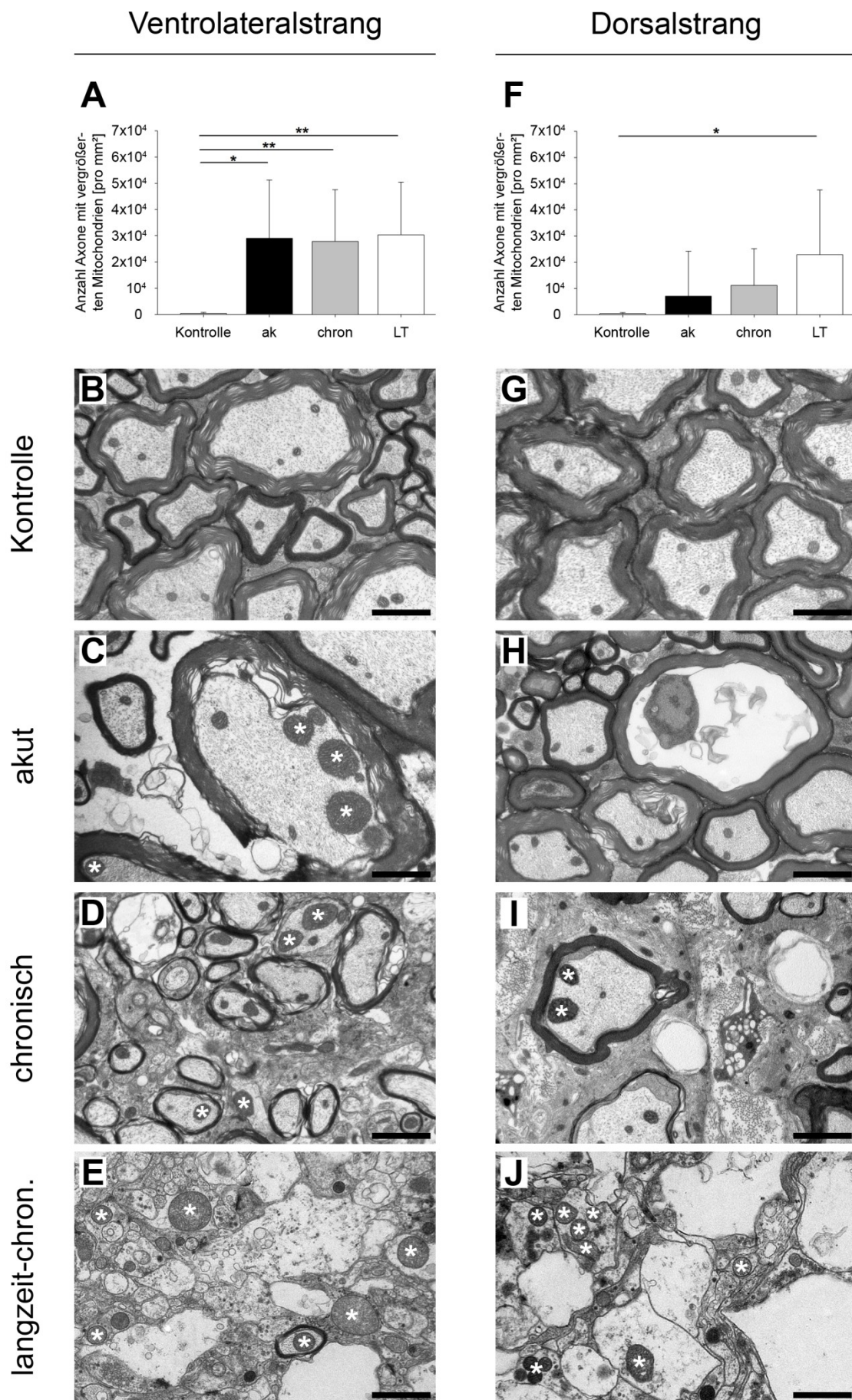
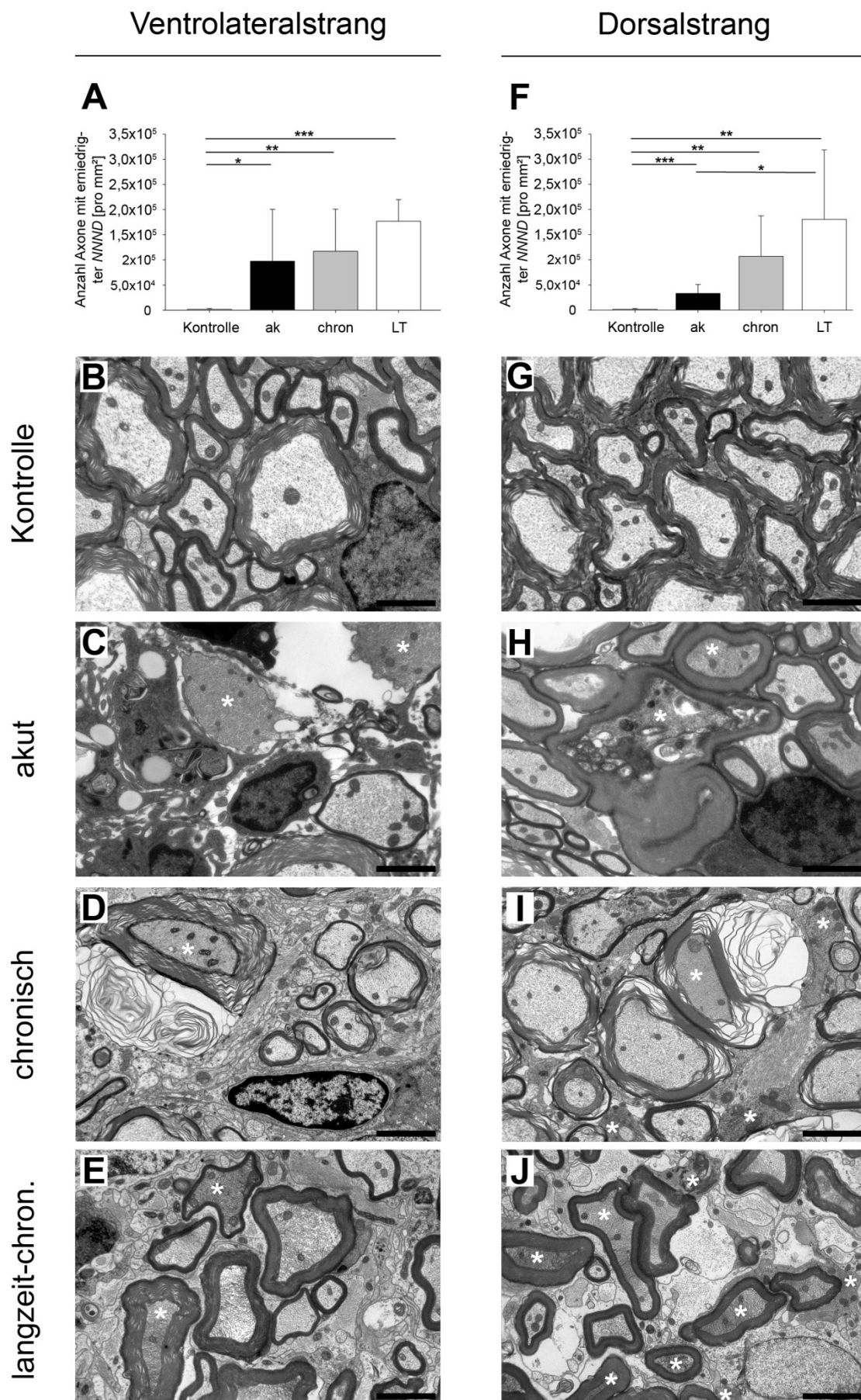


Abb. 3-7. Das Ausmaß der Mitochondrienpathologie war im Ventrolateralstrang über die Zeit hinweg konstant, während im Dorsalstrang ein progressiver Anstieg ermittelt werden konnte. Als Kriterium für eine beginnende, „feine“ Axonschädigung wurde unter Anderem eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien herangezogen. Zur Objektivierung der Auswertung wurde die Größe der Mitochondrien mittels *Mito-Ratio* ermittelt (siehe 2.6.2.1). **(A-E)** Im Ventrolateralstrang waren die errechneten Werte für die *Mito-Ratio* im Gegensatz zu nicht-immunisierten Kontrolltieren erhöht und blieben über die Dauer der Erkrankung hinweg auf demselben Niveau. **(F-J)** Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl an vergrößerten Mitochondrien im Dorsalstrang im Verlauf der Erkrankung stetig zu und blieb zu jeder Zeit unter dem Niveau des Ventrolateralstrangs. Aufgrund der Standardabweichung wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Die einzelnen Experimentalwerte sowie die statistischen Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Tab. 3-1 angegeben (Tab. 3-1). Die Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen aus dem Ventrolateral- bzw. Dorsalstrang nicht-immunisierter Kontrollmäuse **(B, G)** sowie von EAE-Mäusen in der akuten **(C, H)**, chronischen **(D, I)** und langzeit-chronischen **(E, J)** Phase der Erkrankung. Axone mit pathologischer *Mito-Ratio* sind mit einem Asterisk markiert. Ungepaarter *t*-Test $**p < 0,01$; $*p < 0,05$. Die Maßstabsleiste zeigt 1,6 μm . Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.

Abb. 3-8. Die Dichte der axonalen Neurofilamente war bei EAE-Tieren im Gegensatz zu Kontrollmäusen verringert, auch hier ließen sich jedoch strangabhängige Unterschiede feststellen. Als weiteres Anzeichen einer Axonschädigung wurde die Verminderung des Abstandes der einzelnen Neurofilamente im Axon gewertet, wobei die Neurofilamentdichte mithilfe der *NNND* errechnet wurde (siehe 2.6.2.2). **(A)** Im Gegensatz zu nicht-immunisierten Kontrolltieren fanden sich in der Läsionsregion des Ventrolateralstrangs EAE-erkrankter Mäuse vermehrt Axone mit erniedrigter *NNND*. Analog zur *Mito-Ratio* war die Anzahl der Axone mit pathologischer *NNND* in diesem Bahnsystem in allen Krankheitsstadien nicht signifikant unterschiedlich. **(F)** Im Dorsalstrang konnte über den Verlauf der Erkrankung eine progressive Zunahme an Axonen mit pathologischer *NNND* verzeichnet werden, analog zur *Mito-Ratio* erreichten die Werte in diesem Bahnsystem erst in den chronischen Phasen der Erkrankung das Niveau des Ventrolateralstrangs. Die einzelnen Experimentalwerte sowie die statistischen Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Tab. 3-1 angegeben (Tab. 3-1). Die Bilder zeigen exemplarische Aufnahmen von Kontrolltieren sowie von Mäusen aus allen untersuchten Krankheitsstadien der EAE aus dem Ventrolateral- **(B-E)** sowie Dorsalstrang **(G-J)**, die Asterisken markieren Axone mit verminderter *NNND*. Ungepaarter *t*-Test $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$. Die Maßstabsleiste zeigt 1,8 μm . Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.



3.3.3.2 Eine vergrößerte *inner tongue* war kein Indiz für axonalen Schaden

Als weiteres, in der Literatur beschriebenes Merkmal der „feinen“ Axonschädigung (Cook und Wiśniewski, 1973; Edgar et al., 2009; Lappe-Siefke et al., 2003; Morfini et al., 2009) wurde eine Vergrößerung der so genannten *inner tongue* evaluiert. In der vorliegenden Arbeit konnte bei den MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen im Gegensatz zu den Kontrollmäusen eine vergrößerte *inner tongue* nicht vermehrt nachgewiesen werden (Kontrolle 13.756 ± 5.514 Nervenfasern mit vergrößerter *inner tongue*/mm², akute, chronische, langzeit-chronische EAE 7.772 ± 6.946 Nervenfasern mit vergrößerter *inner tongue*/mm²; ungepaarter *t*-Test $p = 0,005$; Ventrolateral- und Dorsalstrang wurden hier zusammengefasst) (Abb. 3-9).

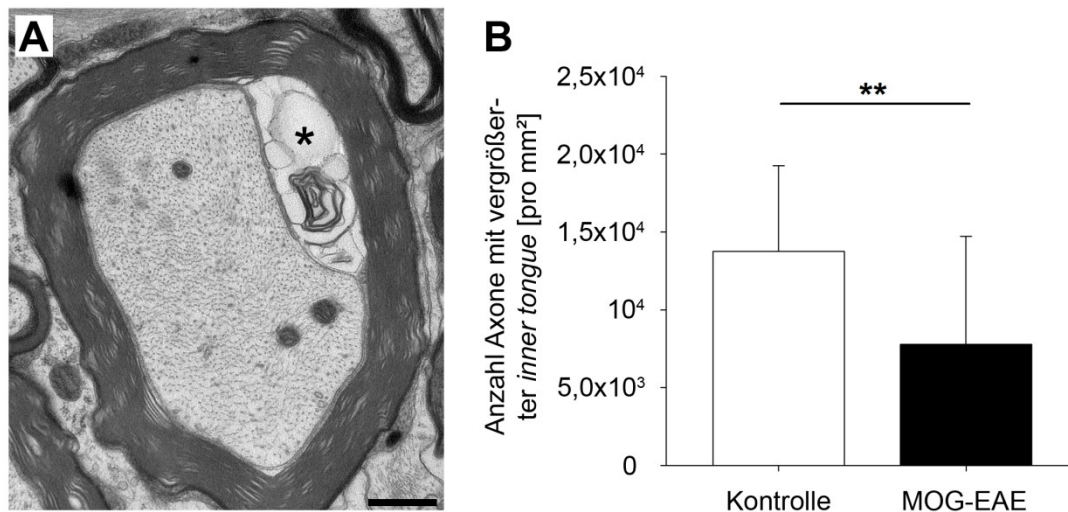


Abb. 3-9. Eine Vergrößerung der *inner tongue* trat bei MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen nicht vermehrt auf. (A) Durch das Anschwellen des Oligodendrozytenfortsatzes, der das Axon umhüllt, entsteht ein zusätzlicher Raum zwischen Axon und Myelinscheide, die so genannte *inner tongue* (Asterisk). **(B)** Kontrollmäuse (13.756 ± 5.514 Nervenfasern mit vergrößerter *inner tongue*/mm²) zeigten häufiger eine Vergrößerung der *inner tongue* als MOG₃₅₋₅₅-immunisierte Mäuse (7.772 ± 6.946 Nervenfasern mit vergrößerter *inner tongue*/mm²). Ungepaarter *t*-Test $**p < 0,01$. Die Maßstabsleiste zeigt 1,25 μ m. MOG-EAE: Läsionsregion des Ventrolateral- und Dorsalstrangs MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse.

3.4 Art des Schadens

Im Anschluss an die getrennte Auswertung der einzelnen ultrastrukturellen Merkmale einer Myelin- und/oder Axonschädigung wurde die Art der Pathologie für jede Nervenfasern bestimmt, wobei die folgenden drei Kategorien zugrunde gelegt wurden: (1) isolierter Myelinschaden, (2) isolierter Axonschaden, (3) kombinierte Schädigung beider Nervenfasernanteile. Die prozentuale Aufteilung der insgesamt ermittelten Anzahl pathologischer Nervenfasern auf die drei Kategorien ergab wesentliche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Bahnsystemen (Tab. 3-2, Abb. 3-10): während im Ventrolateralstrang deutliche Unterschiede zwischen der akuten EAE und den chronischen Krankheitsphasen augenfällig wurden, blieben die Werte für den Dorsalstrang im Zeitraum der Untersuchung relativ konstant.

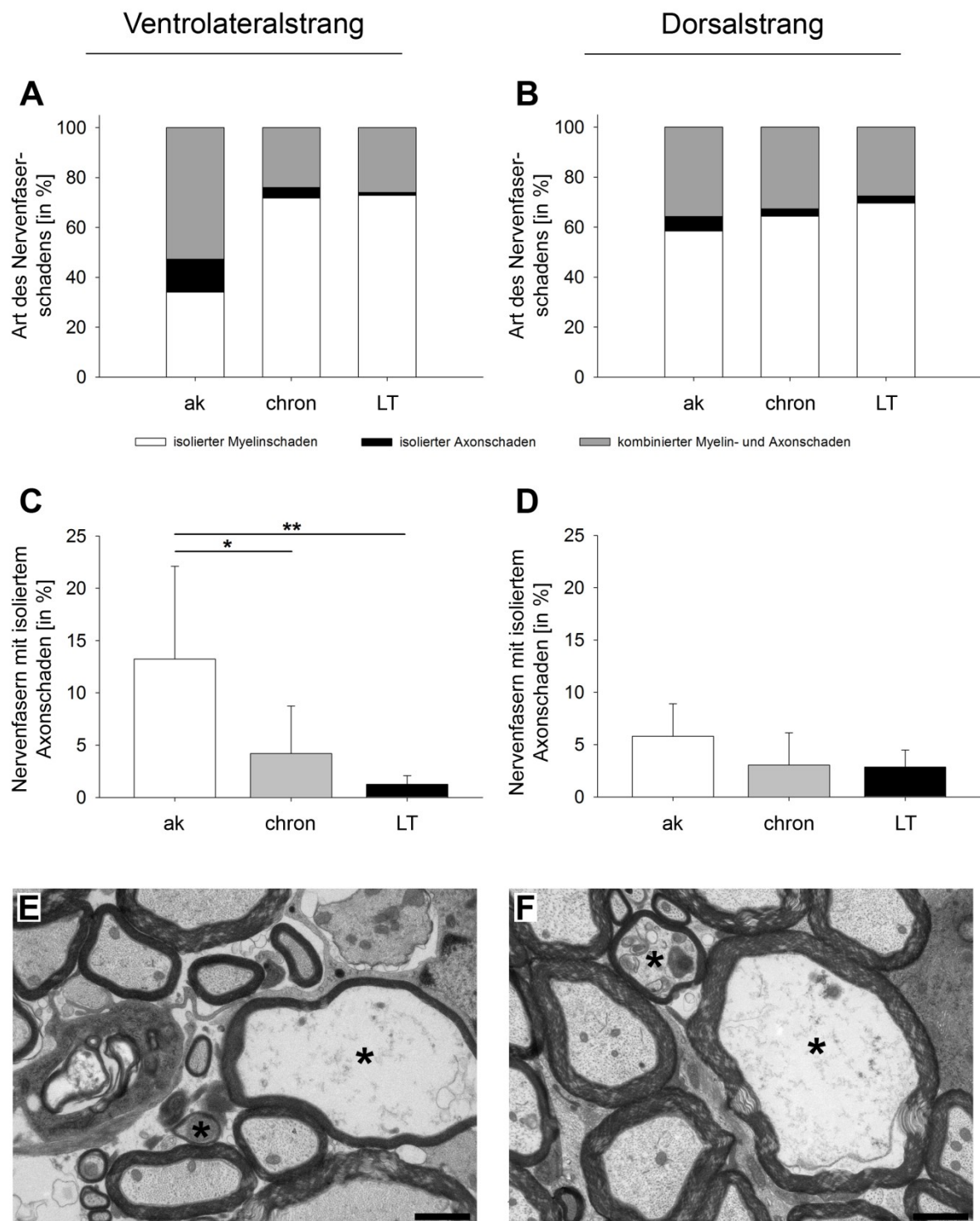
Tab. 3-2. Art des Nervenfaserschadens in der Läsionsregion. Angegeben ist der prozentuale Anteil an der insgesamt gemessenen Nervenfaserschädigung (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

¹Ungepaarter *t*-Test. Ak: akute EAE, chr: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.

Bahnsystem / Krankheitsstadium	isolierter Myelin- schaden [in %]	isolierter Axon- schaden [in %]	kombinierter Schaden [in %]
<u>Ventrolateralstrang:</u>			
akut	34,02 \pm 20,80	13,23 \pm 8,87	52,75 \pm 16,56
chronisch	71,80 \pm 11,45	4,20 \pm 4,53	24,00 \pm 8,12
langzeit-chronisch	72,85 \pm 8,75	1,25 \pm 0,84	25,90 \pm 8,61
	ak vs. chr $p < 0,001^1$	ak vs. chr $p = 0,025^1$	ak vs. chr $p < 0,001^1$
	ak vs. LT $p < 0,001^1$	ak vs. LT $p = 0,002^1$	ak vs. LT $p = 0,001^1$
	chr vs. LT $p = 0,841^1$	chr vs. LT $p = 0,092^1$	chr vs. LT $p = 0,655^1$
<u>Dorsalstrang:</u>			
akut	58,44 \pm 22,09	5,80 \pm 3,11	35,76 \pm 21,12
chronisch	64,34 \pm 12,38	3,04 \pm 3,09	32,61 \pm 11,29
langzeit-chronisch	69,61 \pm 4,97	2,85 \pm 1,62	27,54 \pm 4,91
	ak vs. chr $p = 0,545^1$	ak vs. chr $p = 0,146^1$	ak vs. chr $p = 0,730^1$
	ak vs. LT $p = 0,217^1$	ak vs. LT $p = 0,056^1$	ak vs. LT $p = 0,336^1$
	chr vs. LT $p = 0,313^1$	chr vs. LT $p = 0,887^1$	chr vs. LT $p = 0,292^1$

In letztgenanntem Bahnsystem war in etwa zwei Dritteln der Fälle nur die Myelinscheide betroffen, während etwa 30 % der pathologischen Nervenfasern eine Schädigung beider Nervenfaserstrukturen aufwiesen. Eine isolierte Axonpathologie lag bei rund 3-6 % der Nervenfasern vor, wobei in der akuten Phase der EAE die höchsten Werte ermittelt werden konnten; der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 3-10, B und D; Tab. 3-2). Im Ventrolateralstrang konnte ein ähnliches Bild lediglich für die beiden chronischen Krankheitsphasen ermittelt werden (Abb. 3-10, A; Tab. 3-2). Eine völlig andere Verteilung der drei Kategorien trat jedoch in der akuten Krankheitsphase zutage: hier konnte für die isolierte Axonschädigung ein Wert über 13 % ermittelt werden, während die Anteile der beiden anderen Kategorien entsprechend stark erhöht (kombinierte Schädigung) bzw. erniedrigt (isolierter Myelinschaden) waren (Abb. 3-10, A und C; Tab. 3-2). Die Unterschiede zwischen der akuten und der chronischen bzw. langzeit-chronischen Krankheitsphase erreichten in allen drei Kategorien stets statistische Signifikanz (Tab. 3-2).

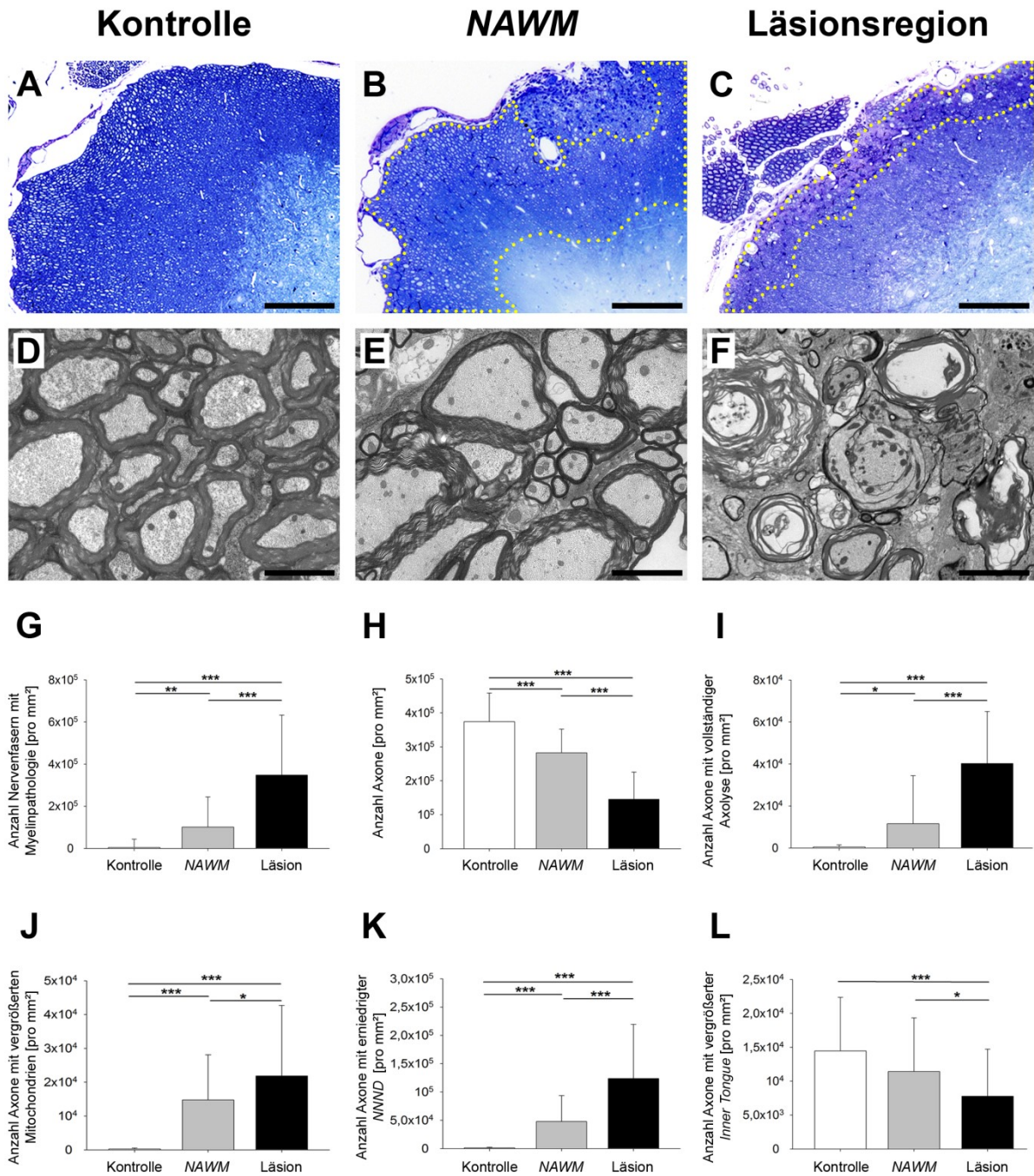
Abb. 3-10. Isolierter Axonschaden trat in allen Krankheitsphasen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE auf. (A, B) Bei der Einteilung der Art des Schadens in isolierte Myelinpathologie (weißer Balken), isolierte Axonpathologie (schwarzer Balken) und kombinierte Schädigung der Nervenfasern (grauer Balken) konnte für den Dorsalstrang in allen drei Krankheitsphasen eine konstante Verteilung ermittelt werden, während im Ventrolateralstrang Unterschiede in der akuten EAE evident wurden. Die einzelnen Experimentalwerte sowie die statistischen Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Tab. 3-2 angegeben (Tab. 3-2). **(C, D)** Bei der getrennten Betrachtung der isolierten Axonschädigung konnte für den Ventrolateralstrang eine statistisch signifikante, progressive Abnahme ermittelt werden, während im Dorsalstrang keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden konnten. **(E, F)** Die Abbildungen zeigen Aufnahmen aus dem Ventrolateral- bzw. Dorsalstrang MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse in der akuten Phase der Erkrankung, die Asterisken markieren Nervenfasern mit isolierter Axonpathologie. Die Maßstabsleiste zeigt 1,5 µm. Ungepaarter *t*-Test ***p* < 0,01; **p* < 0,05. Ak: akute EAE, chron: chronische EAE, LT: langzeit-chronische EAE.



4 Ergebnisteil II – *NAWM*

Zur *NAWM* wurden einerseits die Bereiche aus der weißen Substanz des Ventrolateral- und Dorsalstrangs gezählt, die nicht als Läsionsregion eingestuft wurden, da sie lichtmikroskopisch dem Bild der Kontrolltiere entsprachen (Abb. 4-1, A-C). Zum anderen wurde die gesamte Pyramidenbahn als *NAWM* klassifiziert, da lichtmikroskopisch in diesem Bahnsystem keine klar definierten Läsionsregionen zu erkennen waren (Recks et al., 2011a; Gruppe et al., 2012). Im Gegensatz zum physiologischen Erscheinungsbild der *NAWM* im Lichtmikroskop konnten bei ultrastruktureller Analyse bereits auf den ersten Blick Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und *NAWM* nachgewiesen werden. Obwohl im Gegensatz zur Läsionsregion noch deutlich mehr intakte Axone vorhanden waren, so zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits deutliche Anzeichen für neurodegenerative Veränderungen der Nervenfasern (Abb. 4-1, D-F). Bei der Evaluation der zuvor für die Läsionsregion gezeigten Merkmale einer Myelin- oder Axonschädigung wurden für die *NAWM* stets Werte zwischen Läsions- und Kontrollniveau ermittelt (Abb. 4-1, G-L, Tab. 4-1).

Abb. 4-1. Die lichtmikroskopisch normal erscheinende weiße Substanz (*NAWM*) zeigte bei ultrastruktureller Analyse deutliche Anzeichen einer beginnenden Neurodegeneration. (A-C) Die Bilder zeigen Aufnahmen methylenblaugefärbter Semidünnschnitten aus dem Ventrolateralstrang nicht-immunisierter Kontroll- und MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse. *NAWM* (**B**) und Läsionsregion (**C**) sind eingekreist. (**D-F**) zeigt Aufnahmen der entsprechenden Regionen im Ultradünnschnitt. Bei der Betrachtung der *NAWM* konnten deutliche Unterschiede zwischen licht- und elektronenmikroskopischer Analyse festgestellt werden: im Gegensatz zum physiologischen Erscheinungsbild der *NAWM* in methylenblaugefärbten Semidünnschnitten (vergleiche A und B), konnten ultrastrukturell eindeutige neurodegenerative Befunde nachgewiesen werden (vergleiche D und E). (**G-K**) Bei der Auswertung verschiedener neurodegenerativer Parameter wurden die Ergebnisse aus der Kontrollgruppe sowie aus der *NAWM* und der Läsionsregion MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse miteinander verglichen. Die Werte für die *NAWM* waren für alle ausgewerteten Parameter im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich erhöht, lagen jedoch unter Läsionsniveau. Die einzelnen Experimentalwerte sowie die statistischen Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Gruppen sind in Tab. 4-1 angegeben (Tab. 4-1). Ungepaarter *t*-Test ****p* < 0,001; ***p* < 0,01; **p* < 0,05. Die Maßstabsleiste zeigt 75 µm für die Semi- (A-C) und 2,4 µm für die Ultradünnschnitte (D-F).



Tab. 4-1. Ausgewertete Parameter zur Evaluation der Neurodegeneration bei Kontrolltieren sowie in der *NAWM* und der Läsionsregion *MOG₃₅₋₅₅*-immunisierter Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. ¹Ungepaarter *t*-Test. ²Alle Angaben in Anzahl/mm². Axolyse: Anzahl axolytische Nervenfasern, axonale Dichte: Gesamtanzahl physiologische Axone, *inner tongue*: Anzahl Nervenfasern mit vergrößerter *inner tongue*, Mitochondrien: Anzahl Nervenfasern mit vergrößerten Mitochondrien, Myelinpathologie: Anzahl Nervenfasern mit pathologischer Myelinscheide, *NNND*: Anzahl Nervenfasern mit verringerter *NNND*.

Parameter ²	Kontrolle	<i>NAWM</i>	Läsionsregion
Myelinpathologie	0 \pm 0	101.563 \pm 142,588	348.373 \pm 287.210
axonale Dichte	374.475 \pm 83.946	282.510 \pm 69.873	145.490 \pm 80.207
Axolyse	0 \pm 0	11.563 \pm 22.885	40.221 \pm 24.773
Mitochondrien	0 \pm 0	14.729 \pm 13.349	21.855 \pm 20.816
<i>NNND</i>	0 \pm 0	47.879 \pm 45.750	123.820 \pm 95.722
<i>inner tongue</i>	14.470 \pm 7.904	11.412 \pm 7.914	7.772 \pm 6.946
Statistische Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Gruppen ¹ :			
Kontrolle vs. <i>NAWM</i>	Myelinpathologie p = 0,002; axonale Dichte p < 0,001; Axolyse p = 0,024; Mitochondrien p < 0,001; <i>NNND</i> p < 0,001; <i>inner tongue</i> p = 0,169		
Kontrolle vs. Läsion	alle Parameter p < 0,001		
<i>NAWM</i> vs. Läsion	Myelinpathologie p < 0,001; axonale Dichte p < 0,001; Axolyse p < 0,001; Mitochondrien p = 0,041; <i>NNND</i> p < 0,001; <i>inner tongue</i> p = 0,034		

5 Diskussion

5.1 Ultrastrukturelle Veränderungen in der Läsionsregion

5.1.1 Abhängigkeit der ZNS-Inflammation vom Krankheitsstadium

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus unseren lichtmikroskopischen Studien (Kuerten et al., 2011; Recks et al., 2011a) konnten auch auf ultrastruktureller Ebene Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE nachgewiesen werden. Dabei konnte jedoch weniger eine eindeutige Transition aufgezeigt werden, da Myelin- und Axonpathologien zu jeder Zeit vorhanden waren; vielmehr erfolgte eine Abgrenzung der akuten EAE von den chronischen Krankheitsphasen aufgrund der bereits auf den ersten Blick ersichtlichen inflammatorischen Aktivität, die eine beträchtliche Ödematierung sowie Immunzellinfiltration einschloss (siehe 3.1). Auch andere Arbeitsgruppen konnten für die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE eine Abnahme der inflammatorischen Aktivität über die Zeit hinweg nachweisen. So stellte die Gruppe um Bannerman am Höhepunkt der akuten Phase der EAE (Tag 14 post-Immunisierung), eine markante Immunzellinfiltration fest, während drei Wochen bzw. drei Monate nach Krankheitsbeginn kaum noch Immunzellinfiltrate vorhanden waren (Bannerman et al., 2005). Auch bei MS-Patienten wurde ein Nachlassen der inflammatorischen Aktivität mit der Zeit nachgewiesen: während der akuten Phase der Erkrankung führt das Aufflammen und Abklingen der Entzündung zur schubförmig-remittierenden Klinik der Patienten; die späteren chronisch-progressiven Krankheitsphasen sind dann durch eine Akkumulation der neurodegenerativen Prozesse und weniger durch inflammatorische Läsionen gekennzeichnet (Trapp et al., 2004).

5.1.2 Zunahme der Myelinpathologie mit dem Krankheitsverlauf

Während inflammatorische Prozesse vor allem auf die akute Phase der EAE beschränkt waren, konnten Pathologien der Myelinscheide zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung nachgewiesen werden. Dabei stieg das Ausmaß der Myelinpathologie zeitlich progredient mit der Dauer der Erkrankung stark an, so dass sechs Monate nach Krankheitsbeginn nur noch wenige intakte Myelinscheiden in der Läsionsregion vorhanden waren (siehe 3.2.1). Diese

Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen aus unserer immunhistochemischen Studie, die zwar ebenfalls ein erhebliches Ausmaß an Demyelinisierung in der akuten Phase aufzeigen konnten, jedoch eine Abnahme der Myelinschädigung drei Monate nach Beginn der Erkrankung ergaben, so dass für die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE insgesamt das Bild einer transienten Myelinpathologie entstand (Kuerten et al., 2011). Diese Diskrepanz lässt sich zum einen durch die Verwendung unterschiedlicher Schnittebenen erklären: in der immunhistochemischen Studie wurde die Myelinpathologie mittels anti-MBP-Antikörpern (SMI-99) an Rückenmark-Längsschnitten MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse untersucht, während für die vorliegende Studie Querschnitte des lumbalen Rückenmarks für die ultrastrukturelle Analyse herangezogen wurden. Der Vorteil in der Verwendung von Längsschnitten besteht in einer größeren Anschnittfläche der einzelnen Nervenfasern, so dass eine besonders große Bindungsfläche für den Antikörper vorliegt. Andererseits treten die Rückenmarksläsionen in der murinen EAE vor allem im lumbalen Teil des Rückenmarks auf, so dass bei einem zerviko-thorako-lumbalen Längsschnitt stets die Gefahr besteht, dass sich die betroffene Region außerhalb der Schnittebene befindet. Der Querschnitt hingegen bietet einen flächigen Überblick über eine große Anzahl an Nervenfasern und ermöglicht so eine bessere Abbildung der betroffenen Region. Eine andere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zur Myelinpathologie in der chronischen Phase der Erkrankung liegt in der Tatsache, dass eine immunhistochemische Studie schwerlich mit einer ultrastrukturellen Analyse zu vergleichen ist. Ultrastrukturell sichtbare Veränderungen der Myelinscheide, wie etwa ein Ablösen der Myelinlamellen, sind im Elektronenmikroskop eindeutig als Pathologien sichtbar. In der Immunhistochemie könnten sich diese Strukturen jedoch durchaus normal anfärben, da noch Myelinbestandteile (und somit auch das mittels SMI-99 angefärbte MBP) vorhanden sind, so dass eine physiologische Myelinscheide vorgetäuscht wird. Bei der elektronenmikroskopischen Analyse hingegen wird die Morphologie der Nervenfasern direkt beurteilt und kann so wesentlich eindeutiger bewertet werden. Schließlich konnten auch andere Arbeitsgruppen eine Zunahme der Myelinpathologie über die Zeit beobachten: sowohl die Gruppe um Herrero-Herranz et al., als auch Berard und Kollegen kamen zu dem Ergebnis, dass das Ausmaß der Myelinpathologie in der MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE weniger ein akutes Plateau erreicht und danach abfällt, sondern vielmehr einen progressiven Verlauf zeigt (Berard et al., 2009; Herrero-Herranz et al., 2008). Beide Arbeitsgruppen untersuchten das Auftreten von Myelinschädigungen dabei lichtmikroskopisch an Querschnitten des lumbalen Rückenmarks mittels Luxol-Fast-Blue-Färbung.

In der vorliegenden Arbeit konnten bei der Untersuchung der Art der Myelinpathologie (Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vs. vollständig demyelinisierte Nervenfasern) ebenfalls zeitabhängige Unterschiede festgestellt werden. Zu Beginn der Erkrankung lag ein Nebeneinander von im Prozess der Demyelinisierung befindlichen und vollständig degenerierten Nervenfasern vor. Im Verlauf der Erkrankung nahm die Anzahl an Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung stetig ab, während immer mehr Nervenfasern eine vollständige Degeneration der Myelinscheide aufwiesen. In der langzeit-chronischen Phase der EAE waren schließlich kaum mehr Nervenfasern im Prozess der Demyelinisierung vorhanden und die Läsionsregion bestand aus großflächig demyelinisierten Arealen (siehe 3.2.2).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass zu den verschiedenen Krankheitszeitpunkten unterschiedliche Mechanismen für eine Zerstörung der Myelinscheide verantwortlich sein könnten. Die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE der B6-Maus gilt als Modell für die Kategorie I der *Lucchinetti patterns*, welches durch eine vorwiegend durch T-Zellen und Makrophagen vermittelte Demyelinisierung charakterisiert ist (Gold et al., 2006). Das vermehrte Auftreten von im Prozess der Demyelinisierung befindlichen Nervenfasern in der akuten Phase könnte demnach durch die massive Einwanderung von Immunzellen zustande kommen. Durch den direkten Angriff der Immunzellen werden zunächst die äußersten Bereiche der Nervenfasern angegriffen, so dass es zu einer Zerstörung der Myelinscheide kommt, während das Axon weitestgehend verschont bleibt. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es daher parallel zur Abnahme der inflammatorischen Prozesse auch zu einer Verringerung der im Prozess der Demyelinisierung befindlichen Nervenfasern. Andererseits konnte in der vorliegenden Studie eine enorme Zunahme an Myelinpathologien über die Zeit nachgewiesen werden (siehe 3.2.1). Dies spricht einerseits dafür, dass die im Prozess der Demyelinisierung befindlichen Nervenfasern im Verlauf der Erkrankung der vollständigen Demyelinisierung anheimfallen. Andererseits deutet dies darauf hin, dass die zu Beginn ablaufenden neurodegenerativen Prozesse zunächst durch die inflammatorische Aktivität in der akuten Phase ausgelöst werden, es nachfolgend aber zu einer Verselbstständigung der neurodegenerativen Prozesse kommt (Bjartmar et al., 2003).

Neben der inflammatorisch bedingten Demyelinisierung in der akuten Phase bzw. deren Verselbstständigung in späteren Krankheitsphasen könnten jedoch auch andere Mechanismen zu einer Myelindegeneration führen. Denkbar wäre zum einen eine retrograde Schädigung der Oligodendrozyten, da diese im ZNS für die Myelinisierung mehrerer Nervenfasern zuständig

sind. Die Demyelinisierung einer Nervenfaser durch aktivierte Immunzellen könnte über eine Oligodendrozytenschädigung zur Degeneration der Myelinscheide anderer, ebenfalls von demselben Oligodendrozyten versorgten Nervenfasern führen. Weiterhin wurde für die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE sowohl in der vorliegenden Studie als auch von anderen Arbeitsgruppen eine bereits früh im Krankheitsverlauf auftretende axonale Schädigung beschrieben (siehe 3.3.1-3) (Aharoni et al., 2011; Bannerman et al., 2005; Berard et al., 2009; Herrero-Herranz et al., 2008; Kuerten et al., 2011). Die möglichen Mechanismen einer direkten Zerstörung des Axons sind vielfältig und umfassen zelluläre Zytotoxizität, humorale Faktoren, Dysfunktionen des mitochondrialen Metabolismus sowie eine Störung des axonalen Transports (zusammengefasst in Neumann, 2003 und Recks et al., 2011b). Unabhängig von der Art des einwirkenden Mechanismus könnte ein Verlust der Myelinscheide demnach durch eine primäre Degeneration der gesamten Nervenfaser bedingt sein und weniger durch eine Demyelinisierung intakter Axone. In diesem Zusammenhang konnte die Gruppe um Aharoni et al. mittels ultrastruktureller Analyse zeigen, dass die Myelinpathologie in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE weniger durch das Loslösen oder den vollständigen Abbau der Myelinscheide bei weitestgehend intakten Axonen definiert ist, sondern vielmehr durch eine Schädigung der gesamten Nervenfaser (Myelinscheide plus Axon). Weiterhin konnte in dieser Studie in der akuten Krankheitsphase bereits eine ausgedehnte Axondegeneration, jedoch lediglich geringfügige Demyelinisierung festgestellt werden. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass den pathologischen Prozessen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE ein primär degeneratives Muster zugrunde liegen muss (Aharoni et al., 2011). Zwar konnten auch in der vorliegenden Studie zu Beginn der Erkrankung Axonpathologien ohne gleichzeitige Beeinträchtigung der Myelinscheide nachgewiesen werden (siehe 3.4), dies beweist aber nicht das Auftreten primär degenerativer Prozesse: letztlich können auch Axone mit intakter Myelinscheide durch Sekretionsprodukte aktivierter Makrophagen und Mikroglia wie etwa TNF- α (Neumann et al., 2002), NO (Bö et al., 1994; Redford et al., 1997) oder Glutamat (Piani und Fontana, 1994; Pitt et al., 2000) sekundär geschädigt werden, auch eine Schädigung der Axone durch CD8⁺-Zellen (Howe et al., 2007; Medana et al., 2001; Rivera-Quiñones et al., 1998), eine Beteiligung des Komplementsystems (Mead et al., 2002; Singhrao et al., 2000) sowie eine antikörpervermittelte Schädigung von Axonen (Mathey et al., 2007) wurden beschrieben. Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie in den meisten Phasen der Erkrankung bei etwa zwei Drittel der pathologischen Nervenfasern eine isolierte Schädigung der Myelinscheide mit intaktem Axon nachgewiesen werden (siehe 3.4), so dass die Beteiligung autoreaktiver, myelinspezifischer T-Zellen an der Pathogenese der MOG₃₅₋₅₅-

induzierten EAE sehr wahrscheinlich scheint. Dies lässt den Schluss zu, dass die primäre Degeneration zwar eine Rolle bei der Entstehung der ZNS-Pathologien spielen könnte, sicherlich aber nicht deren hauptsächliche Ursache darstellt. Letztlich kann eine ultrastrukturelle Studie zwar eindeutige Aussagen über die ZNS-Morphologie treffen, lässt aber nur bedingt Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu.

5.1.3 Auftreten regenerativer Prozesse in fortgeschrittenen Krankheitsphasen

Während bei MS-Patienten schon früh im Krankheitsverlauf regenerative Prozesse nachgewiesen werden können (Brück et al., 2003), waren in der vorliegenden Arbeit bei MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen erst nach sechsmonatiger Dauer der Erkrankung vermehrt remyelinisierte Nervenfasern vorhanden (siehe 3.2.3). Dies ist dadurch zu erklären, dass eine großflächige Demyelinisierung bei den Mäusen erst in späten Krankheitsphasen auftrat. Zwar konnten bereits in der akuten EAE sowohl Myelinpathologien als auch vereinzelt regenerative Prozesse nachgewiesen werden, diese Prozesse nahmen jedoch im Verlauf der Erkrankung immer weiter zu, so dass die langzeit-chronische Phase sechs Monate nach Krankheitsbeginn durch ein Nebeneinander von Myelinpathologie und -regeneration gekennzeichnet war. Insgesamt definiert das hauptsächliche Auftreten regenerativer Prozesse in der späten Phase der MOG₃₅₋₅₅-EAE die Remyelinisierung eindeutig als zeitabhängigen Prozess, der mehrere Wochen bis Monate Zeit benötigt, um anzulaufen.

Der Prozess der Remyelinisierung stellt eine Wiederholung der während der physiologischen Myelinisierung ablaufenden Prozesse dar. Im ZNS wird die Myelinisierung durch Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells*, OPC) vermittelt, welche zunächst proliferieren, anschließend zur demyelinisierten, reparaturbedürftigen Nervenzelle wandern und sich schließlich zu reifen, myelinbildenden Oligodendrozyten differenzieren (Stangel, 2004). Mit Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen, Hormonen und Transkriptionsfaktoren wurden eine ganze Reihe Faktoren beschrieben, die einen gewissen Einfluss auf die OPC auszuüben scheinen und somit potentielle Kandidaten für eine remyelinisierungsfördernde Therapie darstellen (Stangel, 2004). Vor allem die Wachstumsfaktoren stehen zurzeit im Interesse großer Forschungsanstrengungen. So wurde z. B. für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (*fibroblast growth factor-2*, FGF-2) gezeigt, dass er sowohl eine Zunahme der OPC, als auch der myelinbildenden Oligodendrozyten bedingen kann (McKinnon et al., 1990). Auch in der MOG₃₅₋₅₅-EAE konnte durch Studien an

FGF-2^{-/-}-Mäusen die remyelinisierende Wirkung und somit die neuroprotektive Bedeutung des FGF-2 aufgezeigt werden (Rottlaender et al., 2011). In dieser Studie kam es bei den FGF-2^{-/-}-Mäusen nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ zu einer schwereren Krankheitsausprägung, einer vermehrten Degeneration der Nervenfasern, einer Verringerung der axonalen Dichte sowie zu einer Abnahme der Remyelinisierung in den ZNS-Läsionen im Gegensatz zu B6-Wildtyp-Mäusen (Rottlaender et al., 2011). Andere Studien hingegen haben gezeigt, dass es nach Aktivierung des FGF-Rezeptors zu einer Hemmung der Myelinproduktion durch die Oligodendrozyten kam (Goddard et al., 2001). Letztlich bedürfen die Mechanismen, durch die ein möglicher myelinprotektiver oder neurodegenerativer Effekt des FGF-2 vermittelt wird, weiterer eingehender Untersuchungen. Bisher konnten durch eine Vielzahl von Studien eine ganze Reihe vielversprechender, potentiell neuroregenerativer Moleküle identifiziert werden, deren Wirkmechanismen sowohl im Mausmodell als auch im Patienten nach wie vor kontrovers diskutiert werden. Aufgrund der profunden Heterogenität der pathologischen Prozesse zwischen verschiedenen MS-Patienten bleibt jedoch die Frage, ob überhaupt ein bestimmtes Agens als am besten geeignet identifiziert werden kann, oder ob nicht vielmehr verschiedene neuroregenerative Ansätze für die verschiedenen Patientensubgruppen entwickelt werden müssen (Stangel, 2004). Insgesamt stellt die Etablierung einer neuroregenerativen Therapie ein überaus wichtiges und hochaktuelles Gebiet der MS-Forschung dar.

Weiterhin auffällig war die Tatsache, dass im Ventrolateralstrang wesentlich mehr Nervenfasern Merkmale einer Regeneration aufwiesen als im Dorsalstrang (siehe 3.2.3). Dies kann durch die größere Ausdehnung der Läsionen im Ventrolateralstrang erklärt werden: während lichtmikroskopisch in diesem Bahnsystem 19,70 % der weißen Substanz pathologisch verändert waren, lag die Größe der Läsionsfläche im Dorsalstrang lediglich bei 11,13 % (siehe Recks et al., 2011a). Sowohl das Ausmaß der Regeneration, als auch die prozentuale Läsionsfläche der weißen Substanz waren demnach im Ventrolateralstrang mehr als anderthalb mal so groß wie im Dorsalstrang (siehe auch Abschnitt 5.1.6).

5.1.4 Erhebliche Verminderung der axonalen Dichte in allen Krankheitsphasen

In der vorliegenden Arbeit konnte in allen Phasen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE ein deutlicher Verlust von Axonen im Gegensatz zu Kontrolltieren festgestellt werden (siehe 3.3.1). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen histopathologischen Studien der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE (Berard et al., 2009; Herrero-Herranz et al., 2008; Kuerten et al., 2011). Die bereits erwähnte Studie von Aharoni et al. konnte mittels ultrastruktureller Analyse sogar eine progressive Zunahme des *axonal loss* über die Zeit verzeichnen (einmonatige Krankheitsdauer: 70 %; zweimonatige Krankheitsdauer: 80 %; viermonatige Krankheitsdauer: 97 %) (Aharoni et al., 2011). Insgesamt konnte aber in allen Studien gezeigt werden, dass ein Verlust von Axonen bereits sehr früh im Krankheitsverlauf auftritt und mindestens über einen Zeitraum von sechs Monaten bestehen bleibt oder sogar zunimmt.

Auch bei der Auswertung des *axonal loss* wurden Unterschiede in den beiden untersuchten Bahnsystemen offenkundig: während im Ventrolateralstrang zu allen Krankheitszeitpunkten eine höchstsignifikante Verminderung der axonalen Dichte im Gegensatz zu Kontrolltieren nachgewiesen werden konnte, traf dies im Dorsalstrang lediglich auf die chronischen Krankheitsphasen drei bzw. sechs Monate nach Einsetzen der ersten klinischen Symptome zu; in der akuten EAE wurde in diesem Bahnsystem keine signifikante Abnahme der Axonzahlen im Gegensatz zur Kontrollgruppe festgestellt, allerdings wurde hier die Signifikanz nur knapp verfehlt ($p = 0,057$) (siehe 3.3.1). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Remyelinisierung sowie der prozentualen Läsionsfläche deuten diese Befunde darauf hin, dass die pathologischen Prozesse im Dorsalstrang generell langsamer ablaufen als im Ventrolateralstrang (siehe auch Abschnitt 5.1.6).

5.1.5 Auftreten einer Degeneration der Axone bereits früh im Krankheitsverlauf und zu allen Krankheitszeitpunkten vermehrt

Im Gegensatz zum zeitlich progredienten Anstieg der Myelinpathologie konnte in der vorliegenden Arbeit eine Axonpathologie in allen Phasen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE vermehrt nachgewiesen werden. Dies traf sowohl für eine vollständige Degeneration des Axons (Axolyse) (siehe 3.3.2), als auch für eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien und eine Verringerung der NNND zu (siehe 3.3.3). Das zeitlich relativ konstante Auftreten von Axonpathologien entsprach sowohl den Ergebnissen aus unseren immunhistochemischen

Untersuchungen (Kuerten et al., 2011), als auch den Befunden anderer Arbeitsgruppen zur Histopathologie der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE (Aharoni et al., 2011; Bannerman et al., 2005; Berard et al., 2009). Der axonale Schaden könnte somit im MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell das morphologische Korrelat für die chronische Klinik der Mäuse darstellen, ähnlich der derzeitigen Vorstellung über den Krankheitsfortschritt bei MS-Patienten: bei den meisten Patienten lassen sich histologisch zwei verschiedene Phasen der Erkrankung abgrenzen: im Anfangsstadium ist die ZNS-Histopathologie durch inflammatorisch-demyelinisierende Läsionen gekennzeichnet, die jedoch, zumindest teilweise, noch reversibel zu sein scheinen und so die schubförmig-remittierende Klinik der Patienten bedingen; später treten fast alle Patienten in ein sekundär-progredientes Stadium mit irreversiblen klinischen Defiziten ein, welches histologisch durch eine stetige Zunahme an Axonpathologien charakterisiert ist (Holmøy, 2008; Lassmann et al., 2007; Lassmann, 2008; Sospedra und Martin, 2005; Trapp et al., 1998; Trapp, 2004). Analog zur Situation bei der SP-MS konnten in der vorliegenden Studie in den chronischen Phasen der Erkrankung insgesamt mehr lytische Axone ermittelt werden als in der akuten EAE, auch wenn der Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte. Eine Zunahme der Axonschädigung über die Zeit hinweg wurde auch von der Gruppe um Aharoni et al. sowohl ultrastrukturell als auch immunhistochemisch nachgewiesen (Aharoni et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass das MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell in der B6-Maus eher die chronische Phase der humanen Erkrankung widerspiegelt, sowohl histologisch, als auch klinisch. Beim Patienten scheint die Schwelle zu einer irreversiblen Schädigung der Axone und somit zur Chronifizierung der Klinik erst in späteren Phasen der Erkrankung erreicht zu werden (Bjartmar et al., 2003); obwohl Axonschädigungen bereits früh im Krankheitsverlauf (während der RR-Phase der Erkrankung) nachweisbar sind (Kuhlmann et al., 2002), scheinen diese erst später, nach Überschreiten des kritischen Schwellenwertes, klinisch in Erscheinung zu treten. Bei den MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen kommt es ebenfalls bereits früh in der Erkrankung zum axonalen Schaden. Analog zur Situation beim SP-MS-Patienten nimmt das Ausmaß der Axonschädigung mit der Zeit weiter zu, das Überschreiten der kritischen Schwelle für die Irreversibilität des Schadens scheint jedoch im Tiermodell bereits zu Beginn der Erkrankung stattzufinden, so dass die Mäuse von Beginn an eine chronische Klinik zeigen. Das Ausmaß der auftretenden Axonschädigung ist dabei, sowohl im Tiermodell als auch bei der menschlichen Erkrankung, sicherlich auch von genetischen Unterschieden zwischen verschiedenen Mausstämmen bzw. Patientenpopulationen abhängig. So kommt es beispielsweise nach Immunisierung von SJL/J-Mäusen mit PLP zu einem schubförmig-remittierenden Verlauf der EAE (Hofstetter et al., 2002),

während die Immunisierung von B6-Mäusen mit demselben Antigen zu einem chronischen Krankheitsverlauf führt (Kuerten et al., 2006), analog zur MOG₃₅₋₅₅-induzierten Erkrankung bei diesem Stamm. Auch bei MS-Patienten sind wahrscheinlich genetische Gründe (mit)verantwortlich dafür, dass der Großteil der Patienten erst nach Jahren in ein progredientes Stadium übergeht, während es bei etwa 10-15 % im Rahmen der PP-MS von Beginn an zu irreversiblen klinischen Defiziten und einem chronischen Krankheitsfortschritt kommt.

Als wichtigstes morphologisch-strukturelles Korrelat einer irreversiblen Behinderung in der SP-Phase beim Patienten (De Stefano et al., 2002; Ferguson et al., 1997; Trapp et al., 1998) kommt dem Auftreten und somit der Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflussung von Axonschädigungen in der frühen Phase der MS große Bedeutung zu. Die heute zugelassenen MS-Therapeutika weisen alle eine antiinflammatorische und immunmodulatorische Wirkungsweise auf. Obwohl einige Arbeitsgruppen einen sekundär neuroprotektiven Effekt dieser Medikamente beobachten konnten (Khan et al., 2005; Narayanan et al., 2001), kamen andere Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen (Paolillo et al., 1999). Trotz dieser möglicherweise auftretenden, sekundären Effekte der antiinflammatorischen Pharmaka sollte die Axonschädigung als wichtigstes Korrelat der klinischen Defizite sicherlich gezielter therapeutisch beeinflusst werden. Letztlich könnte für MS-Patienten gerade die Kombination aus antiinflammatorisch und neuroprotektiv wirksamen Medikamenten die beste Therapiemöglichkeit darstellen. Dabei gibt es viele Mechanismen, die zu einer Schädigung von Axonen führen können, sei es in Abwesenheit oder im Zusammenhang mit einer Myelinschädigung, und die alle potentiell einen axonprotektiven Therapieansatz darstellen (zusammengefasst in Recks et al., 2011b). In der vorliegenden Studie wurden mit dem *mitochondrial swelling* und der Verringerung der *NNND* zwei Parameter identifiziert, die als morphologische Korrelate einer (z. B. durch metabolische Störungen oder durch eine gestörte Reizweiterleitung ausgelösten) Axonpathologie herangezogen werden können.

5.1.6 Strangabhängige Unterschiede in der Kinetik „feiner“ Axonpathologien

Eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien sowie eine Verringerung der *NNND* traten bei den MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Tieren im Gegensatz zu Kontrolltieren zu allen Krankheitsphasen vermehrt auf. Es konnten jedoch erhebliche Unterschiede in der Kinetik der beiden Parameter zwischen Ventrolateral- und Dorsalstrang festgestellt werden: während das Ausmaß der Mitochondrien- und Neurofilamentpathologie im Ventrolateralstrang über die Zeit hinweg relativ konstant blieb, konnte im Dorsalstrang ein zeitlich progredienter Anstieg der beiden Parameter ermittelt werden (siehe 3.3.3.1). Im Ventrolateralstrang deutet die zeitliche Konstanz der „feinen“ Axonschädigungen (analog zur Axolyse) darauf hin, dass schon früh in der Erkrankung Axone betroffen und somit für die klinischen Defizite verantwortlich sind. Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die Anzahl an Axonen mit pathologischen Mitochondrien und Neurofilamenten im Dorsalstrang erst in der langzeit-chronischen Phase der Erkrankung überhaupt das Pathologie-Niveau des Ventrolateralstrangs erreicht. Es scheint also, dass die pathologische Prozess im Dorsalstrang deutlich langsamer ablaufen als im Ventrolateralstrang, so dass das Ausmaß der Pathologie erst nach mehreren Monaten den Schweregrad des Ventrolateralstrangs erreicht. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den zuvor erwähnten Ergebnissen zur Remyelinisierung (siehe 3.2.3) und zum *axonal loss* (siehe 3.3.1).

Eine mögliche Erklärung für die differenzielle Kinetik liegt in der unterschiedlichen Größe der Bahnsysteme: der Dorsalstrang ist wesentlich kleiner als der Ventrolateralstrang, demnach befinden sich dort auch weniger Blutgefäße, durch die Immunzellen ins Gewebe infiltrieren können. In unseren lichtmikroskopischen Untersuchungen der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE haben wir die Anzahl Blutgefäße pro Fläche für beide Bahnsysteme untersucht und konnten im Ventrolateralstrang mehr Blutgefäße nachweisen als im Dorsalstrang (Ventrolateralstrang: 312 ± 80 Blutgefäße/mm², Dorsalstrang 217 ± 58 Blutgefäße /mm², Daten nicht gezeigt). Der Unterschied erreichte höchste statistische Signifikanz ($p < 0,001$, ungepaarter *t*-Test). Eine andere mögliche Erklärung liegt in einer unterschiedlichen Myelinzusammensetzung in den beiden Bahnsystemen. Obwohl MOG generell nur einen sehr kleinen Bestandteil der Myelinscheide ausmacht (siehe 1.5.1), könnten die Nervenfasern im Ventrolateralstrang aufgrund eines höheren MOG-Anteils in den Myelinscheiden einen besseren Angriffspunkt für autoimmune Prozesse darstellen. In diesem Zusammenhang haben sich Coffey und McDermott mit der regionalen Verteilung von MOG im ZNS der Ratte während der ersten 4 Wochen *post natum* beschäftigt. Sie konnten zeigen, dass die MOG-Expression vor allem im

Rückenmark einen anteroposterioren Gradienten aufweist und während der ersten Wochen nach der Geburt im Ventrolateralstrang wesentlich stärker exprimiert wird als im Dorsalstrang. Allerdings konnte bereits am 21. Tag *post natum* kein Unterschied mehr zwischen den beiden Bahnsystemen nachgewiesen werden (Coffey und McDermott, 1997). Die Autoren vermuten, dass diese Traktspezifität durch eine asynchrone Reifung der Oligodendrozytenpopulationen zustande kommt, während die Reifungsprozesse der einzelnen Oligodendrozyten innerhalb einer Population (d. h. innerhalb desselben Bahnsystems) synchron ablaufen. Sie schlussfolgern, dass das Ausmaß der MOG-Expression somit direkt mit dem Reifestadium der Oligodendrozyten korreliert und als verlässlicher Marker für vollständig differenzierte Oligodendrozyten verwendet werden kann (Coffey und McDermott, 1997). Insgesamt deuten sowohl die Unterschiede in der Traktgröße und der Blutgefäßanzahl, als auch die Unterschiede in der MOG-Expression und Oligodendrozytenreifung darauf hin, dass Ventrolateral- und Dorsalstrang eine völlig unterschiedliche Kinetik aufweisen und in der Bewertung pathologischer Prozesse stets getrennt voneinander betrachtet werden sollten.

5.1.7 *Inner tongue*-Vergrößerung bei MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen und bei Kontrolltieren

Eine Vergrößerung der *inner tongue* konnte in der vorliegenden Studie nicht als morphologischer Marker einer beginnenden Axonpathologie identifiziert werden. Insgesamt wurde dieser Parameter bei Kontrolltieren häufiger nachgewiesen als bei MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen, der Unterschied zwischen den beiden Gruppen erreichte jedoch nur im Ventrolateralstrang statistische Signifikanz (siehe 3.3.3.2). Das vermehrte Auftreten dieser „Pathologie“ bei den Kontrolltieren ist dadurch zu erklären, dass die Axone der Kontrolltiere morphologisch intakt waren, während in der Läsionsregion der weißen Substanz MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse in allen Krankheitsphasen vermehrt lytische Axone ermittelt werden konnten. Aufgrund der verminderten Anzahl an „physiologischen“, d. h. nicht durch Axolyse vollständig degenerierten, Axone bei den EAE-Tieren ist diesem Unterschied letztlich keine besondere Bedeutung beizumessen. Wie bereits einleitend erwähnt, wurde die pathologische Bedeutung der *inner tongue* auch von anderen Arbeitsgruppen als gering beurteilt, da sich die Myelinscheide ausdehnen kann, so dass das Axon durch den angeschwollenen Oligodendrozytenfortsatz nicht direkt komprimiert wird (Edgar et al., 2009; Lappe-Siefke et al., 2003; Morfini et al., 2009).

5.1.8 Art des Schadens

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen weiterhin, dass auch bei der Art der Pathologie zwischen Ventrolateral- und Dorsalstrang unterschieden werden muss: bei der Unterteilung in isolierte Myelin- bzw. Axonpathologie und kombinierte Pathologie wurde für den Dorsalstrang ein einheitliches Ergebnis für alle Krankheitsphasen erreicht (ca. 60-70 % isolierter Myelinschaden, ca. 30 % kombinierter Schaden, < 6 % isolierter Axonschaden), während im Ventrolateralstrang deutliche Unterschiede zwischen akuter und chronischer EAE ermittelt werden konnten. In diesem Bahnsystem entsprach die Verteilung der Pathologien in den chronischen Krankheitsphasen dem Ergebnis des Dorsalstrangs, während für die akute Phase der EAE eine gänzliche andere Kinetik nachgewiesen werden konnte (ca. 35 % isolierter Myelinschaden, ca. 50 % kombinierter Schaden, > 13 % isolierter Axonschaden). Diese Diskrepanzen stehen im Einklang mit den bereits in Absatz 5.1.6 diskutierten, generell evidenten Unterschieden zwischen den beiden Bahnsystemen.

5.1.8.1 Axonschaden als Folge von Demyelinisierung

Die Ergebnisse aus dem Dorsalstrang sowie in den chronischen Krankheitsphasen auch aus dem Ventrolateralstrang legen nahe, dass ein Großteil der Nervenfasern mit pathologisch verändertem Axon zusätzlich eine Myelinpathologie aufweist. Das lässt den Schluss zu, dass eine Schädigung der Axone in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE meistens im Anschluss an eine Schädigung der Myelinscheide auftritt und das Axon selber nicht direkt angegriffen wird. Dies entspricht der klassischen Auffassung der MS-Pathologie einer durch inflammatorisch-demyelinisierende Prozesse vermittelten Schädigung des Axons. Diese Annahme liegt nahe, da die Myelinscheide für das Überleben und die Funktion des Axons viele wichtige Funktionen übernimmt: (1) die Myelinisierung ermöglicht dem Axon im Rahmen der saltatorischen Erregungsweiterleitung eine wesentlich schnellere Impulsweiterleitung als dies bei unmyelinisierten Axonen der Fall ist, durch eine gestörte Myelinisierung kommt es daher zu Störungen der Reizweiterleitung am Axon; (2) das Myelin bzw. die Myelinbildenden Zellen (Oligodendrozyten) bilden extrinsische Faktoren, die auf Reifung und Trophik des Axons Einfluss nehmen und unter Anderem die Verteilung der Natriumkanäle am Axolemm, die Neurofilamentphosphorylierung sowie den Axonkaliber beeinflussen können (Wilkins et al., 2003); (3) demyelinisierte Axone können leichter durch Sekretionsprodukte aktivierter Immunzellen geschädigt werden.

5.1.8.2 Isolierter Axonschaden

Andererseits konnte in der vorliegenden Arbeit für die beiden Parameter Myelin- und Axonpathologie eine unterschiedliche Kinetik nachgewiesen werden: während die Myelinscheide in der akuten Phase oft noch intakt war (siehe 3.2.1), konnten bereits zu Beginn der Erkrankung vermehrt Anzeichen einer Axonschädigung ermittelt werden (siehe 3.3.1-3.3.3). Zwar lag das Ausmaß der Axonpathologie in der akuten EAE unter den Werten für die chronischen Krankheitsphasen, jedoch erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den stark erhöhten Werten für eine isoliert auftretende Axonpathologie in der akuten Phase der EAE, vor allem im Ventrolateralstrang. Auch im Dorsalstrang konnten akut vermehrt isolierte Axonpathologien nachgewiesen werden, die Unterschiede zu den chronischen Krankheitsphasen erreichten in diesem Bahnsystem jedoch keine statistische Signifikanz (siehe 3.4). Dies deutet darauf hin, dass eine Schädigung der Axone zumindest teilweise auch in Abwesenheit von Demyelinisierung auftritt. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine Axondegeneration unabhängig von inflammatorisch-demyelinisierenden Prozessen nachweisen, sowohl im Tiermodell, als auch mittels MRS-Studien bei MS-Patienten (De Stefano et al., 2002; Garbern et al., 2002). Einleitend wurde bereits die Arbeitsgruppe um Bitsch et al. erwähnt, die im Hirngewebe von MS-Patienten eine Klassifizierung der Läsionen anhand der vorherrschenden de- und remyelinisierenden Aktivität vornahm. Dabei stellten sie hinsichtlich des Ausmaßes einer akuten Axonschädigung keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Läsionsstadien fest, d. h. sowohl in spät aktiven und inaktiven demyelinisierten Läsionen (im Zusammenhang mit Demyelinisierung), als auch in sehr frischen sowie in remyelinisierten Läsionen (unabhängig von Demyelinisierung) konnten Axonschäden nachgewiesen werden (Bitsch et al., 2000). Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei MS-Patienten bereits früh im Krankheitsverlauf eine Schädigung der Axone auftritt und das Ausmaß der Axonschädigung, zumindest teilweise, unabhängig vom Vorhandensein von Demyelinisierung ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die pathologischen Prozesse in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE nach einem ähnlichen Muster ablaufen wie dies bei MS-Patienten der Fall ist, und bekräftigen somit die Bedeutung der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE der B6-Maus als Tiermodell für die menschliche Erkrankung.

5.1.9 Einfluss des klinischen Schweregrades der Erkrankung auf das Ausmaß der Neurodegeneration in der Läsionsregion

In unserer lichtmikroskopischen Vorgängerstudie wurden die Mäuse zum einen anhand der Erkrankungsdauer eingeteilt, um die Entwicklung der ZNS-Histopathologie über die Zeit hinweg untersuchen zu können. Zum anderen erfolgte eine Einteilung hinsichtlich des klinischen Schweregrads der Erkrankung, d. h. des EAE-Scores der Mäuse zum Zeitpunkt der Gewebeasservation. Während der Zeitpunkt der Erkrankung das Auftreten von inflammatorischen oder neurodegenerativen Prozessen bestimmte, korrelierte der klinische Score eindeutig mit dem Ausmaß der Rückenmarksläsionen (Recks et al., 2011a). In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden die Mäuse lediglich anhand des Erkrankungszeitpunktes (akut, chronisch oder langzeit-chronisch) in drei Gruppen unterteilt, der klinische Schweregrad der Erkrankung wurde dabei nicht berücksichtigt. Da die Mäuse einer Score-Gruppe jedoch jeweils aus unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung stammen und nicht die Größe der ZNS-Läsionen, sondern lediglich das Ausmaß der Pathologie bezogen auf eine bestimmte Fläche im jeweiligen Bahnsystem evaluiert wurde, konnten in der vorliegenden Studie keine Unterschiede hinsichtlich der Ultrastruktur der ZNS-Histopathologie erwartet werden. Entsprechend konnten bei der Einordnung der Ergebnisse aus der vorliegenden Studie in Score-Gruppen keine statistisch signifikanten Ergebnisse erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

5.2 Ultrastrukturelle Veränderungen in der NAWM

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindruckliche Unterschiede zwischen einer licht- und elektronenmikroskopischen Auswertung auf. Im Rückenmark der MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäuse konnte durch lichtmikroskopische Analyse ein guter Überblick über das Ausmaß der Pathologien, insbesondere über die Ausdehnung der Läsionen in der weißen Substanz gewonnen werden. Die Bezirke außerhalb der Läsionsregion erschienen hingegen vollkommen physiologisch und waren von der weißen Substanz gesunder Tiere nicht zu unterscheiden. Bei der ultrastrukturellen Analyse dieser entsprechend als normal erscheinende weißen Substanz (*NAWM*) charakterisierten Bereiche konnte jedoch ein ganz anderes Bild gezeigt werden: obwohl das Ausmaß sämtlicher untersuchter Pathologien nicht das Niveau der Läsionsregion erreichte, konnten im Vergleich zu Kontrollgewebe für jedes der untersuchten Parameter deutlich mehr pathologische Nervenfasern nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, sowohl im Tiermodell als auch bei MS-Patienten (Allen et al., 2001; Herrero-Herranz et al., 2008; Zeis et al., 2008). Die Gruppe um Herrero-Herranz konnte in der *NAWM* MOG₃₅₋₅₅-immunisierter B6-Mäuse einen signifikanten *axonal loss* 40 Tage nach Immunisierung nachweisen, insgesamt war die axonale Dichte zu diesem Zeitpunkt auf 50-60 % reduziert. Dieser fortschreitende Verlust von Axonen in der *NAWM* stand in Zusammenhang mit einer Abnahme der Neurofilamentphosphorylierung, einer erhöhten Expression von Natriumkanälen sowie demyelinisierenden Prozessen, war jedoch unabhängig von akuter Immunzellinfiltration und korrelierte wesentlich mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung (Herrero-Herranz et al., 2008). Insgesamt konnte also auch in dieser Studie eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei der *NAWM* keineswegs um gesundes, d. h. vollkommen physiologisches Rückenmarksgewebe handelt, sondern dass diese eindeutige Anzeichen neurodegenerativer Prozesse aufweist. Die Autoren mutmaßen, dass das Auftreten von *axonal loss* in der *NAWM* des lumbalen Rückenmarks durch weiter kranial gelegene Läsionen im zervikalen oder thorakalen Rückenmark verursacht werden könnte (Herrero-Herranz et al., 2008). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es nach einem fokalen Axonschaden nicht nur durch den Prozess der Wallerschen Degeneration zu einem Absterben des distalen, vom Perikaryon abgetrennten Teil kommt, sondern auch der proximale, noch in Kontakt zum Perikaryon stehende Teil zugrunde gehen kann; über antero- und retrograde neuronale Verknüpfungen kann es letztlich sogar zum Absterben weit entfernter Neurone kommen (Perry und Anthony, 1999). Um diese Theorie zu bestätigen wäre es von besonderem Interesse, auch die weiter rostral gelegenen

Anteile des Rückenmarks MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse einer ultrastrukturellen Analyse zu unterziehen.

In der vorliegenden Studie wurde der Begriff der *NAWM* als lichtmikroskopisch normal erscheinende weiße Substanz definiert, in der mittels ultrastruktureller Analyse jedoch Alterationen der Nervenfasern aufgefunden werden können. Beim MS-Patienten hingegen bezieht sich der Begriff der *NAWM* auf eine im konventionellen MRT unauffällig erscheinende Region der weißen Substanz, in der mittels fortgeschrittenen MRT- sowie MRS-Untersuchungen jedoch signifikante Veränderungen nachgewiesen werden können. Studien haben gezeigt, dass die *NAWM* bei der Mehrzahl der MS-Patienten signifikante Anomalien aufweist, unter anderen BHS-Veränderungen, Axonschädigungen sowie Astro- und Mikrogliazellen (Aboul-Enein et al., 2003; Fu et al., 1998; Silver et al., 2001). Die Gruppe um Zeis et al. konnte zusätzlich Veränderungen auf genetischer Ebene in der *NAWM* nachweisen. Sie zeigten, dass es in der *NAWM* von MS-Patienten zum einen zu einer Hochregulation von Genen kommt, die im Zusammenhang mit antiinflammatorischen Mechanismen stehen. Diese durch Oligodendrozyten vermittelten Mechanismen können die endgültige Läsionsformation verhindern oder zumindest einschränken. Andererseits konnte parallel eine Hochregulation der Gene für proinflammatorische Mechanismen nachgewiesen werden, welche vor allem mit Mikrogliazellen assoziiert waren und zu einem Fortschreiten der Erkrankung führen könnten (Zeis et al., 2008). Die in der *NAWM* offenkundigen Veränderungen könnten also darauf hindeuten, dass bereits vor der definitiven Formation einer Läsion Alterationen auf genetischer und molekularer Ebene auftreten, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Mechanismen umfassen. Insgesamt scheint sich die *NAWM* bei MS-Patienten in einem feinen Gleichgewicht zwischen Inflammation und Neuroprotektion zu befinden: es hat zwar noch keine Infiltration von Immunzellen stattgefunden, jedoch bereits eine Präkonditionierung des Immunsystems, so dass sowohl schützende als auch schädliche Mechanismen bereits aktiviert wurden (Zeis et al., 2008).

Insgesamt zeigen die in der *NAWM* evidenten Veränderungen der weißen Substanz ganz klar die Wichtigkeit der Entwicklung gezielt neuroprotektiv wirksamer Therapien auf. Wie bereits erwähnt wurde, sind eine Vielzahl von möglichen Effektormechanismen und -molekülen beschrieben worden, die zu einer Schädigung von Axonen führen können (zusammengefasst in Neumann, 2003; Recks et al., 2011b) und deren Blockade entsprechend als Therapieansatz genutzt werden könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass sich insbesondere die MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE der B6-Maus für solche Studien eignet, da sie

zum einen viele histopathologische Gemeinsamkeiten mit der menschlichen Erkrankung aufweist, zum anderen aber auch eine Vielzahl von genetisch veränderten Stämmen auf diesem Hintergrund erhältlich sind, so dass die Auswirkung einzelner Moleküle gut in Knock-In oder Knock-Out-Tieren untersucht werden kann.

5.3 Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende, ultrastrukturelle Charakterisierung der neurodegenerativen Prozesse Demyelinisierung und Axonschaden in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE der B6-Maus über einen Zeitraum von sechs Monaten. Während für das Ausmaß der Myelinpathologie ein progressiver Verlauf über die Zeit hinweg ermittelt werden konnte, traten Axonschädigungen zeitlich relativ konstant auf. Betrachtet man die chronische Klinik der Mäuse in diesem EAE-Modell, so unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung der Axopathologie als morphologisch-strukturelles Korrelat für den klinischen Schweregrad der Erkrankung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch im Tiermodell bereits früh in der Erkrankung eine Schädigung der Axone auftritt und diese, zumindest teilweise, auch in Abwesenheit von Inflammation und Demyelinisierung vorzufinden ist. Eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien sowie eine Verringerung des Neurofilamentabstandes im Axon konnten als morphologische Merkmale einer frühen Axonschädigung etabliert werden. Schließlich wurde nachgewiesen, dass die lichtmikroskopisch normal erscheinende weiße Substanz durchaus pathologische Veränderungen der Nervenfasern aufweist. Insgesamt konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass mit der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE viele Charakteristika der MS abgebildet werden können und sie somit ein überaus geeignetes Tiermodell für mechanistische Studien über den Einfluss einzelner neurodegenerativer, aber auch neuroprotektiver Moleküle darstellt. Weiterhin wurde die Relevanz der Entwicklung einer gezielt neuroprotektiven Therapie beim MS-Patienten durch die vorliegenden Ergebnisse eindeutig bekräftigt.

6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) gilt als Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und ist durch multizentrische Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigung charakterisiert. Trotz großer Forschungsanstrengungen bleiben die zugrunde liegenden Pathomechanismen unverstanden. Die Untersuchung pathogenetischer Mechanismen am Menschen ist mit großen Schwierigkeiten verbunden, daher sind Tiermodelle auch heute noch unerlässlich, um grundlegende Mechanismen der Läsionsentstehung im ZNS verstehen und die Läsionsformation über die Zeit verfolgen zu können. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis ist eines der am häufigsten verwendeten Modelle der MS. Insbesondere der C57BL/6 (B6)-Mausstamm ist für mechanistische Studien unabdingbar, da viele genmodifizierte Mäuse auf diesem Hintergrund gezüchtet werden. Eines der traditionellen Modelle der B6-EAE ist die Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein Peptid 35-55 (MOG₃₅₋₅₅)-induzierte EAE. Aufgrund der Ähnlichkeit der histopathologischen Charakteristika der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE mit der menschlichen Erkrankung und aufgrund der einfachen Verfügbarkeit und Herstellbarkeit des MOG₃₅₋₅₅ stellt dieses Modell eines der am häufigsten verwendeten MS-Modelle dar. Bevor jedoch die pathogenetische und/oder therapeutische Bedeutung einzelner Effektormechanismen evaluiert werden kann, bedarf es einer eingehenden Charakterisierung des verwendeten Modells.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die inflammatorische Komponente der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE untersucht und auch die Rolle neurodegenerativer Prozesse wurde, unter anderem von unserer Arbeitsgruppe, in lichtmikroskopischen und immunhistochemischen Studien bereits evaluiert. Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die eine Charakterisierung der Myelin- und Axonpathologien in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE auf ultrastruktureller Ebene vornimmt. Um die Histopathologie der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE der B6-Maus über einen Zeitraum von sechs Monaten untersuchen zu können, wurden eindeutige morphologische Korrelate einer Myelin- und Axonschädigung herangezogen, um zeitabhängige Unterschiede und/oder Ähnlichkeiten zwischen der akuten, chronischen und langzeit-chronischen Phase der EAE zu beurteilen. Für diesen Zweck wurden Querschnitte des lumbalen Rückenmarks MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse zum Zeitpunkt der akuten EAE (erstes Auftreten der paralytischen Symptome), drei Monate (chronische EAE) und sechs

Monate nach Krankheitsbeginn (langzeit-chronische EAE) angefertigt, in EPON eingebettet und mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

Das Ausmaß der Myelinpathologie wurde mittels Messung der *g-ratio* (Axondurchmesser geteilt durch Gesamtdurchmesser der Nervenfasern) evaluiert und nahm zeitlich progredient zu. Eine Schädigung der Axone hingegen konnte bereits früh im Krankheitsverlauf vermehrt nachgewiesen werden und blieb über den beobachteten Zeitraum von sechs Monaten konstant erhöht. Als axonale Pathologien wurden axonaler Verlust, Axolyse, eine Vergrößerung der axonalen Mitochondrien sowie eine Verringerung im Abstand benachbarter Neurofilamente im Axon (*NNND*) gewertet. In Übereinstimmung mit der Situation beim MS-Patienten zeigt diese Erkenntnis eindrücklich die Bedeutung des axonalen Schadens als morphologisch-strukturelles Korrelat irreversibler klinischer Schäden auf, entsprechend dem chronischen Krankheitsverlauf in diesem Modell. Weiterhin konnten wir bereits früh im Krankheitsverlauf das Auftreten einer isolierten Axonschädigung ohne gleichzeitige Pathologie der Myelinscheide nachweisen. Diese Beobachtung zeigt, dass eine axonale Schädigung, zumindest teilweise, auch in Abwesenheit von Myelinpathologien auftreten kann. Dies bestärkt die Notwendigkeit, auch neuroprotektive Therapiestrategien zu entwickeln und damit die immunmodulierende Basistherapie zu ergänzen.

Auch das Auftreten regenerativer Prozesse, d. h. eine Remyelinisierung der zuvor demyelinisierten Myelinscheide, konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen und als Charakteristikum der langzeit-chronischen EAE identifiziert werden. Bei der Auswertung der Myelin- und Axonpathologien wurde zur Evaluation der Traktspezifität stets zwischen Ventrolateral- und Dorsalstrang unterschieden, wobei insgesamt für die beiden untersuchten Bahnsysteme eine völlig unterschiedliche Läsionskinetik gefunden werden konnte. Neben der Untersuchung der Läsionsregion der weißen Substanz wurde in der vorliegenden Studie auch die lichtmikroskopisch normal erscheinende weiße Substanz (*normal-appearing white matter, NAWM*) evaluiert. In dieser Region konnten wir im Gegensatz zu Kontrollgewebe vermehrt Myelin- und Axonpathologien nachweisen, das Ausmaß der Pathologie lag zwischen Kontrollgewebe und Läsionsregion.

Ingesamt legen die Ergebnisse der vorliegenden Studie nahe, dass die histopathologischen Charakteristika der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE der B6-Maus viele Aspekte der MS Pathologie widerspiegeln und dieses Modell daher besonders gut für mechanistische Studien über den Einfluß sowohl neuroprotektiv als auch neurodegenerativ wirkender Mechanismen in autoimmunen ZNS-Erkrankungen geeignet ist.

7 Summary

The human disease multiple sclerosis (MS) is considered to be an autoimmune disorder characterized by multicentric central nervous system (CNS) inflammation, demyelination and axonal pathology. Despite tremendous scientific effort, the underlying pathomechanisms still remain to be elucidated. Since mechanistic studies are difficult to carry out in humans, MS research is still largely dependent on suitable animal models to investigate the patterns and kinetics of lesion formation in the CNS. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) has been studied for decades as an animal model for MS. In particular the C57BL/6 (B6) strain is gaining increasing importance since most gene-modified mice are on this background and are needed for mechanism-oriented studies. One of the traditional models in B6 mice is myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 (MOG₃₅₋₅₅)-induced EAE. The histopathological features of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE closely mirror the hallmarks of the human disease. Along with the easy availability and producibility of MOG₃₅₋₅₅, this renders MOG₃₅₋₅₅-induced EAE one of the most commonly used animal models of MS. However, an in-depth characterization of the employed model is a prerequisite for such downstream mechanistic studies on the pathogenetic and/or therapeutic impact of single effector pathways and molecules.

Various studies have dealt with the inflammatory component of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE and among others our group has previously investigated the role of neurodegenerative processes in lightmicroscopic and immunohistochemical studies. However, the present study is the first to evaluate the patterns of demyelination and axonal pathology of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE on the ultrastructural level. Using distinct morphologic correlates of myelin and axonal damage, we assessed the histopathology of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE in B6 mice over the course of time to determine the stage-dependent differences and/or similarities between acute, chronic and long-term chronic stages of the disease. For this purpose, transverse segments of the lumbar spinal cord of MOG₃₅₋₅₅-immunized mice were obtained at the peak of acute EAE, three months after EAE onset (chronic EAE) and six months after the first day of paralytic symptoms (long-term chronic EAE), EPON-embedded and evaluated by electron microscopy.

The extent of myelin pathology in CNS lesions was evaluated by measurement of the *g-ratio* (axon diameter divided by nerve fiber diameter) and increased progressively over the course of time. Conversely, axonal pathology was present already at disease onset and could

be observed constantly in the chronic stages of the disease. Features of axonal damage covered axonal loss, axolysis, mitochondrial swelling and decrease in nearest neighbour neurofilament distance (*NNND*). This renders axonal damage the morphologic-structural correlate of irreversible clinical impairment, strongly supporting the concept that has been proposed for MS patients. Furthermore, we were able to show the occurrence of isolated axonal damage without concurrent myelin damage already early on in the disease course, a finding which demonstrates that axonal pathology can occur, at least partly, independently of myelin pathology. These data clearly point towards the need for alternative therapeutic strategies that are not only immune modulatory, but also neuroprotective.

Another finding was the observation that regeneration of the myelin sheath, i.e. remyelination of previously demyelinated nerve fibers, is a consistent feature of the long-term chronic stage of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE. We also evaluated the tract-specificity of myelin and axonal damage investigating the ventrolateral and dorsal column. Our data demonstrate striking differences in the kinetics of lesion pathology between the two tract systems. Besides the assessment of CNS white matter lesions, we also evaluated the extent of neurodegeneration in the so-called *normal-appearing white matter (NAWM)*. Here, we were able to show an increase in myelin and axonal pathologies compared to control tissue, ranging between the extent of pathology in control tissue and white matter lesions.

In sum, our ultrastructural analysis revealed that the histopathologic features of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE in B6 mice closely mirror many facets of MS pathology and that this model is ideally suited for mechanistic studies on the impact of both neuroprotective and neurodegenerative mechanisms in autoimmune CNS diseases.

8 Literaturverzeichnis

ABOUL-ENEIN F, RAUSCHKA H, KORNEK B, STADELMANN C, STEFFERL A, BRÜCK W, LUCCHINETTI C, SCHMIDBAUER M, JELLINGER K, LASSMANN H (2003) Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 25-33.

AHARONI R, VAINSHTEIN A, STOCK A, EILAM R, FROM R, SHINDER V, ARNON R (2011) Distinct pathological patterns in relapsing-remitting and chronic models of experimental autoimmune encephalomyelitis and the neuroprotective effect of glatiramer acetate. *J Autoimmun* 37: 228-241.

ALLEN IV, McQUAID S, MIRAKHUR M, NEVIN G (2001) Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 22: 141-4.

BAGASRA O, MICHAELS FH, ZHENG YM, BOBROSKI LE, SPITSIN SV, FU ZF, TAWADROS R, KOPROWSKI H (1995) Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12041-12045.

BANNERMAN PG, HAHN A, RAMIREZ S, MORLEY M, BÖNNEMANN C, YU S, ZHANG GX, ROSTAMI A, PLEASURE D (2005) Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain* 128: 1877-1886.

BATOULIS H, RECKS MS, ADDICKS K, KUERTEN S (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis – achievements and prospective advances. *APMIS* 119: 819-830.

BAXTER AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7: 904-912.

BEN-NUN A, WEKERLE H, COHEN IR (1981) The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11: 195-199.

BEN-NUN A, KERLERO DE ROSBO N, KAUSHANSKY N, EISENSTEIN M, COHEN L, KAYE JF, MENDEL I (2006) Anatomy of T cell autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): prime role of MOG44F in selection and control of MOG-reactive T cells in H-2b mice. *Eur J Immunol* 36: 478-493.

BERARD JL, WOLAK K, FOURNIER S, DAVID S (2009) Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia* 58: 434-445.

BERER K, MUES M, KOUTROLOS M, RASBI ZA, BOZIKI M, JOHNER C, WEKERLE H, KRISHNAMOORTHY G (2011) Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479: 538-541.

BERNARD CC, JOHNS TG, SLAVIN A, ICHIKAWA M, EWING C, LIU J, BETTADAPURA J (1997) Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75: 77-88.

BITSCH A, SCHUCHARDT J, BUNKOWSKI S, KUHLMANN T, BRÜCK W (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123: 1174-1183.

BJARTMAR C, WUJEK JR, TRAPP BD (2003) Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 206: 165-171.

BLAKEMORE WF (1973) Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprizone. *J Neurol Sci* 20: 73-83.

BÖ L, DAWSON TM, WESSELINGH S, MÖRK S, CHOI S, KONG PA, HANLEY D, TRAPP BD (1994) Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 36: 778-786.

BONDAN EF, LALLO MA, GRAÇA DL (2008) Ultrastructural study of the effects of cyclosporine in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide demyelinating model. *Arq Neuropsiquiatr* 66: 378-384.

BRÜCK W, KUHLMANN T, STADELMANN C (2003) Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206: 181-185.

CHARCOT JM (1868) Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hop civils et militaires* 140: 554-555 und 141: 557-558 und 143: 566.

CHOMIAK T, HU B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* 2009; 4: e7754.

CLEMENTS CS, REID HH, BEDDOE T, TYNAN FE, PERUGINI MA, JOHNS TG, BERNARD CC, ROSSJOHN J (2003) The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11059-11064.

COFFEY JC, MCDERMOTT KW (1997) The regional distribution of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in the developing rat CNS: an in vivo immunohistochemical study. *J Neurocytol* 26: 149-161.

COMPSTON A, COLES A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372: 1502-1517.

COOK RD, WIŚNIEWSKI HM (1973) The role of oligodendroglia and astroglia in Wallerian degeneration of the optic nerve. *Brain Res* 61: 191-206.

DAL CANTO MC, KIM BS, MILLER SD, MELVOLD RW (1996) Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)-Induced Demyelination: A Model for Human Multiple Sclerosis. *Methods* 10: 453-461.

DE STEFANO N, MATTHEWS PM, FU L, NARAYANAN S, STANLEY J, FRANCIS GS, ANTEL JP, ARNOLD DL (1998) Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121: 1469-1477.

DE STEFANO N, NARAYANAN S, FRANICS SJ, SMITH S, MORTILLA M, TARTAGLIA MC, BARTOLOZZI ML, GUIDI L, FEDERICO A, ARNOLD DL (2002) Diffuse axonal and tissue injury in patients with multiple sclerosis with low cerebral lesion load and no disability. *Arch Neurol* 59: 1565-1571.

DE STEFANO N, GUIDI L, STROMILLO ML, BARTOLOZZI ML, FEDERICO A (2003) Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 24 Suppl 5: S283-286.

DE WAEGH SM, LEE VM, BRADY ST (1992) Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68: 451-463.

DELLA GASPERA B, PHAM-DINH D, ROUSSEL G, NUSSBAUM JL, DAUTIGNY A (1998) Membrane topology of the myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Eur.J Biochem* 258: 478-484.

DENIC A, JOHNSON AJ, BIEBER AJ, WARRINGTON AE, RODRIGUEZ M, PIRKO I (2011) The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 18: 21-29.

DOMINGUES HS, MUES M, LASSMANN H, WEKERLE H, KRISHNAMOORTHY G (2010) Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 5: e15531.

DUKE RC (1989) Self recognition by T cells. I. Bystander killing of target cells bearing syngeneic MHC antigens. *J Exp Med* 170: 59-71.

DYER CA (2002) The structure and function of myelin: from inert membrane to perfusion pump. *Neurochem Res* 27: 1279-1292.

EBERS GC (2008) Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7: 268-277.

EDGAR JM, MCLAUGHLIN M, WERNER HB, MCCULLOCH MC, BARRIE JA, BROWN A, FAICHNEY AB, SNAIDERO N, NAVE KA, GRIFFITHS IR (2009) Early ultrastructural defects of axons and axon-glia junctions in mice lacking expression of Cnp1. *Glia* 57: 1815-1824.

EHLING R, LUTTEROTTI A, WANSCHITZ J, KHALIL M, GNEISS C, DEISENHAMMER F, REINDL M, BERGER T (2004) Increased frequencies of serum antibodies to neurofilament light in patients with primary chronic progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 10: 601-606.

ENCINAS JM, MANGANAS L, ENIKOLOPOV G (2005) Nitric oxide and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5: 232-238.

FERGUSON B, MATYSZAK MK, ESIRI MM, PERRY VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120: 393-399.

FU L, MATTHEWS PM, DE STEFANO N, WORSLEY KJ, NARAYANAN S, FRANCIS GS, ANTEL JP, WOLFSON C, ARNOLD DL (1998) Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 121: 103-113.

FUJINAMI RS, OLDSTONE MB (1985) Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230: 1043-1045.

FUJINAMI RS, VON HERRATH MG, CHRISTEN U, WHITTON JL (2006) Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* 19: 80-94.

GARBERN JY, YOOL DA, MOORE GJ, WILDS IB, FAULK MW, KLUGMANN M, NAVE KA, SISTERMANS EA, VAN DER KNAAP MS, BIRD TD, SHY ME, KAMHOLZ JA, GRIFFITHS IR (2002) Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 125: 551-561.

GODDARD DR, BERRY M, KIRVELL SL, BUTT AM (2001) Fibroblast growth factor-2 inhibits myelin production by oligodendrocytes in vivo. *Mol Cell Neurosci* 18: 557-569.

GOLD R, LININGTON C, LASSMANN H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129: 1953-1971.

GOVERMAN J, BRABB T (1996) Rodent models of experimental allergic encephalomyelitis applied to the study of multiple sclerosis. *Lab Anim Sci* 46: 482-492.

GRUPPE TL, RECKS MS, ADDICKS K, KUERTEN S. The extent of ultrastructural spinal cord pathology reflects disease severity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Histol Histopathol* 27:1163-1174.

GUY J, ELLIS EA, HOPE GM, EMERSON S (1991) Maintenance of myelinated fibre g ratio in acute experimental allergic encephalomyelitis. *Brain* 1991; 114: 281-294.

HEIN T, HOPFENMÜLLER W (2000) Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71: 288-294.

HERRERO-HERRANZ E, PARDO LA, GOLD R, LINKER RA (2008) Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 30: 162-173.

HICKEY WF (2001) Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36: 118-124.

HOFMAN FM, HINTON DR, JOHNSON K, MERRILL JE (1989) Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 170: 607-612.

HOFSTETTER HH, SHIVE CL, FORSTHUBER TG (2002) Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 169: 117-125.

HOLMØY T (2008) The immunology of multiple sclerosis: disease mechanisms and therapeutic targets. *Minerva Med* 99: 119-140.

HOWE CL, ADELSON JD, RODRIGUEZ M (2007) Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis* 25: 354-359.

JOHNS TG, BERNARD CC (1999) The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 72: 1-9.

KENT SJ, KARLIK SJ, CANNON C, HINES DK, YEDNOCK TA, FRITZ LC, HORNER HC (1995) A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 58: 1-10.

KHAN O, SHEN Y, CAON C, BAO F, CHING W, REZNAR M, BUCCHEISTER A, HU J, LATIF Z, TSELIS A, LISAK R (2005) Axonal metabolic recovery and potential neuroprotective effect of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 11: 646-651.

KIESEIER BC, KIEFER R, CLEMENTS JM, MILLER K, WELLS GM, SCHWEITZER T, GEARING AJ, HARTUNG HP (1998) Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 121: 159-166.

KIPP M, CLARNER T, DANG J, COPRAY S, BEYER C (2009) The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol* 118: 723-736.

KORNEK B, LASSMANN H (1999) Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol* 9: 651-656.

KRISHNAMOORTHY G, WEKERLE H (2009) EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol* 39: 2031-2035.

KUERTEN S, ANGELOV DN (2008) Comparing the CNS morphology and immunobiology of different EAE models in C57BL/6 mice - a step towards understanding the complexity of multiple sclerosis. *Ann Anat* 190: 1-15.

KUERTEN S, LICHTENEGGER FS, FAAS S, ANGELOV DN, TARY-LEHMANN M, LEHMANN PV (2006) MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 177: 99-111.

KUERTEN S, KOSTOVA-BALES DA, FRENZEL LP, TIGNO JT, TARY-LEHMANN M, ANGELOV DN, LEHMANN PV (2007) MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol* 189: 31-40.

KUERTEN S, JAVERI S, TARY-LEHMANN M, LEHMANN PV, ANGELOV DN (2008) Fundamental differences in the dynamics of CNS lesion development and composition in MP4- and MOG peptide 35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 129: 256-267.

KUERTEN S, GRUPPE TL, LAURENTIUS LM, KIRCH C, TARY-LEHMANN M, LEHMANN PV, ADDICKS K (2011) Differential patterns of spinal cord pathology induced by MP4, MOG peptide 35-55, and PLP peptide 178-191 in C57BL/6 mice. *APMIS* 119: 336-346.

KUHLMANN T, LINGFELD G, BITSCH A, SCHUCHARDT J, BRÜCK W (2002) Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125: 2202-2212.

LAPPE-SIEFKE C, GOEBBELS S, GRAVEL M, NICKSCH E, LEE J, BBRAUN PE, GRIFFITHS IR, NAVE KA (2003) Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33: 366-374.

LASSMANN H (2008) Mechanisms of inflammation induced tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 274: 45-47.

LASSMANN H, BRÜCK W, LUCCHINETTI C (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7: 115-121.

LASSMANN H, BRÜCK W, LUCCHINETTI CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17: 210-218.

LEHMANN PV, FORSTHUBER T, MILLER A, SERCARZ EE (1992) Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358: 155-157.

LUCCHINETTI C, BRÜCK W, PARISI J, SCHEITHAUER B, RODRIGUEZ M, LASSMANN H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707-717.

LUDWIN SK (1978) Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest* 39: 597-612.

LUNN MP, CRAWFORD TO, HUGHES RA, GRIFFIN JW, SHEIKH KA (2002) Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies alter neurofilament spacing. *Brain* 125: 904-911.

MAO P, REDDY PH (2010) Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta* 1802: 66-79.

MATHEY EK, DERFUSS T, STORCH MK, WILLIAMS KR, HALES K, WOOLLEY DR, AL-HAYANI A, DAVIES SN, RASBAND MN, OLSSON T, MOLDENHAUER A, VELHIN S, HOHLFELD R, MEINL E, LININGTON C (2007) Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 204: 2363-2372.

MATSUSHIMA GK, MORELL P (2001) The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11: 107-116.

MCFARLIN DE, MCFARLAND HF (1982) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 307: 1183-1188 und 1246-1251.

MCKINNON RD, MATSUI T, DUBOIS-DALCQ M, AARONSON SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5: 603-614.

MEAD RJ, SINGHRAO SK, NEAL JW, LASSMANN H, MORGAN BP (2002) The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 168: 458-465.

MEDANA I, MARTINIC MA, WEKERLE H, NEUMANN H (2001) Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 159: 809-815.

MENDEL I, KERLERO DE ROSBO N, BEN-NUN A (1995) A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25: 1951-1959.

MENGE T, LALIVE PH, VON BÜDINGEN HC, CREE B, HAUSER SL, GENAIN CP (2005) Antibody responses against galactocerebroside are potential stage-specific biomarkers in multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* 116: 453-459.

MERRILL JE, SCOLDING NJ (1999) Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25: 435-458.

MINAGAR A, ALEXANDER JS (2003) Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 9: 540-549.

MIX E, MEYER-RIENECKER H, ZETTL UK (2008) Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies – potential and limitations. *J Neurol* 255 Suppl 6: 7-14.

MORFINI GA, BURNS M, BINDER LI, KANAAN NM, LAPOINTE N, BOSCO DA, BROWN RH JR, BROWN H, TIWARI A, HAYWARD L, EDGAR J, NAVE KA, GARBERN J, ATAGI Y, SONG Y, PIGINO G, BRADY ST (2009) Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci* 29: 12776-12786.

MULLER DM, PENDER MP, GREER JM (2005) Blood-brain barrier disruption and lesion localisation in experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant cerebellar and brainstem involvement. *J Neuroimmunol* 160: 162-169.

NARAYANAN S, DE STEFANO N, FRANCIS GS, ARNAOUTELIS R, CARAMANOS Z, COLLINS DL, PELLETIER D, ARNASON BGW, ANTEL JP, ARNOLD DL (2001) Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol* 248: 979-986.

NEUMANN H (2003) Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Curr Opin Neurol* 16: 267-273.

NEUMANN H, SCHWEIGREITER R, YAMASHITA T, ROSENKRANZ K, WEKERLE H, BARDE YA (2002) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci* 22: 854-862.

NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E (2004) Rückenmark. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band IV. Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen. Hrsg. G. Böhme. Parey Verlag, Stuttgart, 4. Auflage: 28-61.

NOSEWORTHY JH, LUCCHINETTI C, RODRIGUEZ M, WEINSHENKER BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343: 938-952.

OLESZAK EL, CHANG JR, FRIEDMAN H, KATSETOS CD, PLATSOUKAS CD (2004) Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clin Microbiol Rev* 17: 174-207.

OLIVER AR, LYON GM, RUDDLE NH (2003) Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice. *J Immunol* 171: 462-468.

PAOLILLO A, COLES AJ, MOLYNEUX PD, GAWNE-CAIN M, MACMANUS D, BARKER GJ, COMPSTON DA, MILLER DH (1999) Quantitative MRI in patients with secondary progressive MS treated with monoclonal antibody Campath 1H. *Neurology* 53: 751-757.

PERRY VH, ANTHONY DC (1999) Axon damage and repair in multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1641-1647.

PETZOLD A, GVERIC D, GROVES M, SCHMIERER K, GRANT D, CHAPMAN M, KEIR G, CUZNER L, THOMPSON EJ (2008) Phosphorylation and compactness of neurofilaments in multiple sclerosis: indicators of axonal pathology. *Exp Neurol* 213: 326-335.

PHAM-DINH D, MATTEI MG, NUSSBAUM JL, ROUSSEL G, PONTAROTTI P, ROECKEL N, MATHER IH, ARTZT K, LINDAHL KF, DAUTIGNY A (1993) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7990-7994.

PIANI D, FONTANA A (1994) Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol* 152: 3578-3585.

PITT D, WERNER P, RAINE CS (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6: 67-70.

PLUMB J, MCQUAID S, MIRAKHUR M, KIRK J (2002) Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol* 12: 154-169.

REBOLDI A, COISNE C, BAUMJOHANN D, BENVENUTO F, BOTTINELLI D, LIRA S, UCCELLI A, LANZAVECCHIA A, ENGELHARDT B, SALLUSTO F (2009) C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10: 514-523.

RECKS MS, ADDICKS K, KUERTEN S (2011a) Spinal cord histopathology of MOG peptide 35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is time- and score-dependent. *Neurosci Lett* 494: 227-231.

RECKS MS, BADER J, KAISER CC, SCHROETER M, FINK GR, ADDICKS K, KUERTEN S (2011b) Die Bedeutung axonaler Pathologie für das Konzept der Neurodegeneration bei der Multiplen Sklerose. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79: 161-170.

REDFORD EJ, KAPOOR R, SMITH KJ (1997) Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 120: 2149-2157.

RIVERA-QUÍÑONES C, MCGAVERN D, SCHMELZER JD, HUNTER SF, LOW PA, RODRIGUEZ M (1998) Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat Med* 4: 187-193.

ROTTLAENDER A, VILLWOCK H, ADDICKS K, KUERTEN S (2011) Neuroprotective role of fibroblast growth factor-2 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology* 133: 370-378.

SANDERS P, DE KEYSER J (2007) Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain Res Rev* 54: 274-285.

SCHOLZ C, PATTON KT, ANDERSON DE, FREEMAN GJ, HAFLER DA (1998) Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol* 160: 1532-1538.

SCHON EA, MANFREDI G (2003) Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* 111: 303-312.

SELMAJ K, RAINE CS, CANNELLA B, BROSNAN CF (1991) Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 87: 949-954.

SILBER E, SEMRA YK, GREGSON NA, SHARIEF MK (2002) Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* 58: 1372-1381.

SILVER NC, TOFTS PS, SYMMS MR, BARKER GJ, THOMPSON AJ, MILLER DH (2001) Quantitative contrast-enhanced magnetic resonance imaging to evaluate blood-brain barrier integrity in multiple sclerosis: a preliminary study. *Mult Scler* 7: 75-82.

SINGHRAO SK, NEAL JW, RUSHMERE NK, MORGAN BP, GASQUE P (2000) Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis. *Am J Pathol* 157: 905-918.

SMITH AJ, LIU Y, PENG H, BEERS R, RACKE MK, LOVETT-RACKE AE (2011) Comparison of a classical Th1 bacteria versus a Th17 bacteria as adjuvant in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 237: 33-38.

SOSPEDRA M, MARTIN R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747.

STANGEL M (2004) Remyelinating and neuroprotective treatments in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 13: 331-347.

STEINMAN L (1996) Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85: 299-302.

STEWART O, ZHENG B, HO C, ANDERSON K, TESSIER-LAVIGNE M (2004) The dorsolateral corticospinal tract in mice: an alternative route for corticospinal input to caudal segments following dorsal column lesions. *J Comp Neurol* 472: 463-477.

STORCH MK, PIDDLESSEN S, HALTIA M, IIVANAINEN M, MORGAN P, LASSMANN H (1998) Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43: 465-471.

STROMNES IM, GOVERMAN JM (2006) Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1: 1952-1960.

STROMNES IM, CERRETTI LM, LIGGITT D, HARRIS RA, GOVERMAN JM (2008) Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 14: 337-342.

TERASHIMA T (1995) Anatomy, development and lesion-induced plasticity of rodent corticospinal tract. *Neurosci Res* 22: 139-161.

THEILER M (1937) Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. *J Exp Med* 65: 705-719.

TOMPKINS SM, PADILLA J, DAL CANTO MC, TING JP, VAN KAER L, MILLER SD (2002) De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168: 4173-4183.

TRAPP BD (2004) Mechanisms of axonal loss and neuronal dysfunction in MS. *Adv Stud Med* 4: S312-S315.

TRAPP BD, PETERSON J, RANSOHOFF RM, RUDICK R, MÖRK S, BÖ L (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338: 278-285.

TSUNODA I, FUJINAMI RS (2010) Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5: 355-369.

VIGLIETTA V, BAECHER-ALLAN C, WEINER HL, HAFLER DA (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971-979.

WAXMAN FJ, FRITZ RB, HINRICHS DJ (1980) The presence of specific antigen-reactive cells during the induction, recovery, and resistance phases of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol* 49: 34–42.

WEKERLE H, KOJIMA K, LANNES-VIEIRA J, LASSMANN H, LININGTON C (1994) Animal models. *Ann Neurol* 36: S47-53 (Suppl).

WILKINS A, MAJED H, LAYFIELD R, COMPSTON A, CHANDRAN S (2003) Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23: 4967-4974.

WUCHERPFENNIG KW (2001) Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 108: 1097-1104.

WUCHERPFENNIG KW, STROMINGER JL (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80: 695-705.

YEDNOCK TA, CANNON C, FRITZ LC, SANCHEZ-MADRID F, STEINMAN L, KARIN N (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356: 63-66.

ZEIS T, GRAUMANN U, REYNOLDS R, SCHAEREN-WIEMERS N (2008) Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 131: 288-303.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Frau PD Dr. med. Stefanie Kürten für die ausgezeichnete Betreuung und uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit, ihr stets offenes Ohr und ihre Geduld sowie die vielen konstruktiven Diskussionen und Ideen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Klaus Addicks für seine großzügige Unterstützung und sein wissenschaftliches Interesse an meiner Arbeit sowie für die offenen und sachbezogenen Diskussionen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold für die Bereitschaft, die Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen, sein Interesse an meiner Arbeit sowie für die wissenschaftlichen Ratschläge und Ideen.

Christian Hoffmann und Evelyn Janßen für ihre exzellente technische Unterstützung in allen Fragen rund um die Elektronenmikroskopie.

Jolanta Kozlowski für ihre Hilfsbereitschaft, sowohl im Labor, als auch außerhalb.

Allen **Kollegen, Mitarbeitern und Doktoranden** des Instituts I für Anatomie für die gemeinsame Zeit in der Anatomie, an die ich mich immer gerne erinnern werde, insbesondere **Helena Batoulis** für die vielen konstruktiven Diskussionen und die gute Laune.

Monika Esser für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Sascha, der mich in jeder Gemütslage tapfer ausgehalten und alle Höhen und Tiefen mit mir durchgestanden hat und mir, nicht nur durch seine exzellente kulinarische Unterstützung, die Arbeit erheblich erleichtert hat.

Vor allem aber danke ich **meinen Eltern**, die mich immer uneingeschränkt unterstützt und entscheidend dazu beigetragen haben, dass ich soweit kommen konnte.

9.2 Publikationsliste

Originalarbeiten

KUERTEN S, SCHICKEL A, KERKLOH C, **RECKS MS**, ADDICKS K, RUDDLE NH, LEHMANN PV (2012) Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response. *Acta Neuropathol*, in press.

KUERTEN S, BATOULIS H, **RECKS MS**, KARACSONY E, ZHANG W, SUBBRAMANIAN RA, LEHMANN PV (2012) Resting of Cryopreserved PBMC Does Not Generally Benefit the Performance of Antigen-Specific T Cell ELISPOT Assays. *Cells* 1: 409-427.

GRUPPE TL*, **RECKS MS***, ADDICKS K, KUERTEN S (2012) The extent of ultrastructural spinal cord pathology reflects disease severity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Histol Histopathol* 27: 1163-1174.

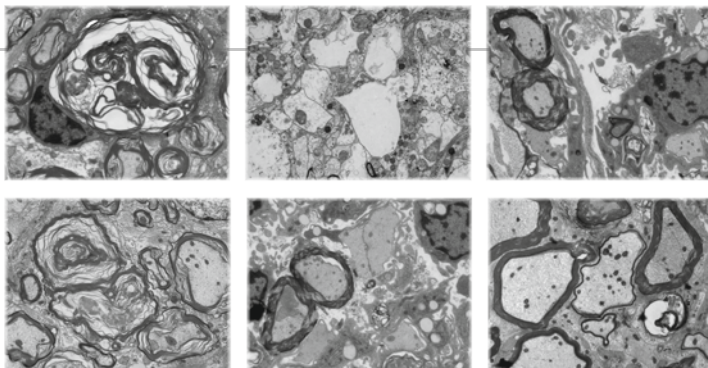
RECKS MS, ADDICKS K, KUERTEN S (2011) Spinal cord histopathology of MOG peptide 35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is time- and score-dependent. *Neurosci Lett* 494: 227-231.

Übersichtsarbeiten

BATOULIS H*, **RECKS MS***, ADDICKS K, KUERTEN S (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis – achievements and prospective advances. *APMIS* 119: 819-830.

RECKS MS, BADER J, KAISER CC, SCHROETER M, FINK GR, ADDICKS K, KUERTEN S (2011) Die Bedeutung axonaler Pathologie für das Konzept der Neurodegeneration in der Multiplen Sklerose. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79: 161-170.

* beide Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5934-7

